CAMPUS
DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Producción Agraria

Evaluación del riesgo ecológico de insecticidas utilizados contra plagas
hortícolas en el agente de control biológico *Nesidicoris tenuis* Reuter
(Heteroptera: Miridae)

TESIS DOCTORAL

Andrea Carolina Wanumen Riaño

Licenciada en Ciencias Biológicas

2016

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Producción Agraria

Evaluación del riesgo ecológico de insecticidas utilizados contra plagas
hortícolas en el agente de control biológico *Nesidicoris tenuis* Reuter
(Heteroptera: Miridae)

TESIS DOCTORAL

Andrea Carolina Wanumen Riaño

Licenciada en Ciencias Biológicas

Directores:

Ángeles Adán del Río

Dra. en Ciencias

Ismael Ignacio Sánchez Ramos

Dr. en Ciencias Biológicas

Tribunal nombrado por el Magfco. Y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día de de 2016.

Presidente D./Da

Vocal D./D.a

Vocal D./D.a

Vocal D./D.a

Secretario D./D.a

Suplente D./D.a

Suplente D./D.a

Realizada la lectura y defensa de la tesis el día de de 2016 en Madrid, en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

Fdo.:

Fdo.:

LOS VOCALES

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

A mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano,
a la pequeña Ana María y a Andrés.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Colciencias (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación) por otorgarme la beca doctoral y a Laspau (Latin American Scholarship Program of American Universities) por facilitarme los tramites académicos durante todo el periodo de mis estudios.

Es difícil expresar lo agradecida que estoy con cada una de las personas que he coincidido a lo largo de estos años, pero lo intentaré... En primer lugar quiero darle mil gracias a mi tutora, Ángeles, quien desde el primer día me acogió con mucho cariño, por confiar en mí, por toda la paciencia que ha tenido y por la ayuda que me ha brindado, siempre con la mejor energía del mundo. A mi tutor Ismael, aunque a veces sentía la mirada de “pero porque hiciste eso??!!!”, lo que aprendí de él, la claridad con que ve los datos y experimentos y lo “fácil” que hace ver la estadística, es impresionante. A los dos, muchísimas gracias por todo!!!!!!.

En segundo lugar a todo el grupo de trabajo, que realmente funciona como una familia, pues desde el primer día al encontrarme en un país extraño me hicieron sentir como en casa. A Elisa, por ser siempre un punto de referencia y dirigir este grupo de trabajo como hasta ahora. A Pilar, por ser la piedra angular del grupo y dar los mejores consejos en el momento oportuno, tanto a nivel académico como personal. A Flor, por tener siempre una sonrisa y una energía contagiante justo cuando lo necesitas. A Pedro, porque a su lado siempre aprendes, no solo de entomología, de vino, de quesos, de pan, en fin... gracias por que transmite mucho conocimiento de la forma mas clara y sencilla posible. A Miguel Angel Ibañez, por toda su ayuda en lo referente a la respuesta funcional. A Carmen Dieguez, por ayudarnos en todos los trámites finales con el rectorado.

A los compañeros de trabajo, que realmente son amigos. A Paloma y Rosita con quienes coincidí al inicio de este periodo, chicas muchas gracias por los momentos de trabajo y la ayuda, por las risas tanto dentro, como fuera del laboratorio. Al doctor Amor, *el adulto*, no imaginas lo agradecida que estoy por haber encontrado como mini jefe a una persona como tú, me enseñaste todo lo referente a Nesi, al movimiento en el laboratorio, a mezclar la investigación con

la risa, recuerdo con agrado muchos consejos y como te preocupabas, siempre como un hermano mayor y de quien aprendí el tan famoso “todo bien”, que sabias palabras... Y al hablar de risa no puedo dejar de pensar en el doctor Garzón, una persona incondicional, en quien confiar al 100%, con quien compartí en Madrid y en Lavras miles de horas de risa y trabajo (más de risa). Agus, muchas gracias por todo, no puedo expresar lo feliz que me hace tener un amigo como tú, con quien hablar y filosofar acerca del mundo, del futuro y de la felicidad. A Marcita (lo siento aún no me sale doctora Fernández), con quien compartí muchas horas de angustiosa escritura (artículos, tesis, inglés, español), al fin nos dimos cuenta que la tesis sí tiene un final, gracias por los bailes anti estrés, por los consejos, los libros (guiño, guiño), gracias a que tenemos mucho en común esta última etapa fue mil veces más llevadera.

A Celeste, pues desde el periodo de Máster me ayudo y acompaño en todo momento y aún lo hace de forma incondicional. A Anita (Moreno) su alegría contagiosa y su disposición de ayuda, sin importar qué, ni cómo. Chicas están iniciando o en la mitad el doctorado, tranquilas, aunque en momentos las cosas se verán oscuras, existe luz al final del túnel. A Anita (Murcia) la forma en que ve la vida, tan natural y espontánea, transmite tranquilidad y eso fue algo que realmente necesitaba en los últimos meses.

A Luis, Yara y Nacho, quienes siempre me han ayudado cuando les he necesitado. A las personas con quienes compartí siempre momentos agradables en “reuniones” del laboratorio como Luis Hiernaux y Luis Ricote. A Jorge y Antonio, aunque me dieron un poco de guerra, todo salió estupendo. A Napo, Gonzalo, Sergio, Miriam, Valentin, Sotero y Clifford por los alegres y divertidos momentos compartidos. A las personas que siempre me brindaron una sonrisa y una mano amiga Mario, Thiago, Rubén y Larita, muchas gracias por que mientras compartimos en el laboratorio, también me enseñaron infinidad de cosas, muchas gracias y muchas veces para todos!!!!

A turma de seletividade no Brasil. Geraldo, por me ajudar em todos os momentos que eu precise, assim como o pai. A Lea, *tupicho*, por seu amor, o trabalho, a música e dança. Obrigada por me ajudar na minha curta estadia no Brasil (UFLA). Jader, Rafa, Valeria, Pablo, Rodrigo, Thais, Andrea, Ronelza, DeJane, Frontino, Lucas, Juraci e dona Irene, muito obrigada pela ajuda e amizade. As meninas da pequenhna republica, Elisangela, Poli e Carolina muito

obrigada por tudo. Al pequeño Colombia en Brasil, Jordi, Judith, Valeria, Kili y Cristian.

A Cesar por recibirme en su laboratorio y ser como un amigo de toda la vida durante mi estancia en New Jersey. To Kriss, Andrew and Nakorn, for the daily laugh and long talks we had. Thanks for sharing in Pinelands, on the beach, on the lake, your friends, movies, parties, more and more... Elvira, Chris, Rob, Sarah, Evan, Mike, Fernando, Gabrielle, Kate, thanks for sharing pinelands, camping, parties, BBQ. Even if we didn't talk and sometimes we had to use mimic to communicate us, it was a really funny and awesome summer. Thanks a lot guys!!!!!! Y nuevamente a Jordi, porque sin él, esta estancia no se hubiera podido realizar, por su cariño durante el tiempo que coincidimos, fue extraño encontrar a una persona tan parecida a mí (en algunas facetas).

Finalmente, nada de esto podría ser posible sin el apoyo constante de mi familia, pues nunca me han cortado las alas para volar por el mundo. A mis padres y hermano, por ser siempre un referente en el cual apoyarme y al cual recurrir en todo momento y ayudarme a ser la persona que soy. Aunque en ocasiones les extraño, nunca los he sentido lejos ni distantes, al contrario, siempre han estado presentes en cada paso que he dado durante estos cinco años lejos de casa. A Ana María y Valentina, por enseñarme a amar a pequeñas personitas a miles de kilómetros a la distancia. A las Andreas (Bony y Vásquez), por ser amigas incondicionales, sin importar el tiempo que pueda pasar entre charla y charla. A Lobo, Nata, David y Aleja, gracias por su amistad durante todos este tiempo. Y a mí cosa, por apoyarme durante tantos años, por ser mi novio pero también mí mejor amigo, quien me conoce mejor que yo misma. Gracias por hacerme inmensamente feliz, porque eres tan diferente a mí, pero a la vez somos iguales. Estoy segura que juntos solo pasaran cosas buenas en la vida.

ÍNDICE	I
RESUMEN	VII
SUMMARY	XIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Manejo Integrado de Plagas	1
1.2. Evaluación de la compatibilidad entre el control químico y el biológico	5
1.2.1. Rutas de contaminación	7
1.2.2. Tipos de efectos en agentes benéficos	8
1.2.2.1. Efecto letal y subletal	8
1.2.2.2. Efecto total	9
1.3. <i>Nesidiocoris tenuis</i>	11
1.3.1. Sistemática	11
1.3.2. Descripción y biología	11
1.3.2.1. Ciclo de vida	11
1.3.2.2. Hábitos de alimentación	14
1.3.2.3. Comportamiento en la reproducción	15
1.3.3. Distribución	16
1.3.4. Importancia como agente de control biológico	16
1.4. Insecticidas evaluados	18
1.4.1. Deltametrina	18
1.4.2. Flonicamida	19
1.4.3. Flubendiamida	20
1.4.4. Imidacloprid	20
1.4.5. Indoxacarb	21
1.4.6. Metaflumizona	22
1.4.7. Spiromesifén	22
1.4.8. Spirotetramat	23
1.4.9. Sulfoxaflor	24

CAPÍTULO II. OBJETIVOS	27
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	29
3.1. Descripción de los lugares de los ensayos	29
3.1.1. Condiciones de laboratorio	29
3.1.2. Condiciones de invernadero	31
3.2. Material biológico y su manejo	32
3.2.1. Material vegetal	32
3.2.2. Cría de <i>Nesidiocoris tenuis</i>	34
3.3. Análisis estadísticos	35
3.3.1. T-Student o Student-Fisher	36
3.3.2. Análisis de varianzas, ANOVA	37
3.3.3. Análisis de covarianzas, ANCOVA	39
3.3.4. Test de las mínimas diferencias significativas, LSD	39
3.3.5. Test de Dunn	40
3.3.6. Distribución de Weibull	40
3.4. Clasificación toxicológica de los insecticidas	42
3.4.1. Categoría más desfavorable	42
3.4.2. Efecto total	42
CAPÍTULO IV. TOXICIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS POR CONTACTO RESIDUAL SOBRE <i>NESIDIOCORIS TENUIS</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO	45
4.1. Introducción	45
4.2. Objetivos	49
4.3. Materiales y métodos	49
4.3.1. <i>Nesidiocoris tenuis</i>	49
4.3.2. Exposición de ninfas y adultos a residuos frescos sobre sustrato inerte	50
4.3.2.1. Aplicación de los productos	50
4.3.2.2. Efecto letal	51
4.3.2.3. Efecto en la reproducción	54
4.3.3. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal. Evaluación de la persistencia	56
4.3.3.1. Aplicación de los productos	56
4.3.3.2. Evaluación del efecto letal	59
4.3.3.3. Evaluación en la reproducción	60

4.4. Resultados	61
4.4.1. Exposición de ninfas y adultos a residuos frescos sobre sustrato inerte	61
4.4.1.1. Efecto letal	61
4.4.1.2. Efectos subletales	64
4.4.1.2.1. Efecto en el desarrollo ninfal	64
4.4.1.2.2. Efecto en la reproducción	68
4.4.1.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas (residuo fresco sobre sustrato inerte)	69
4.4.2. Exposición de adultos a residuo vegetal. Evaluación de persistencia	71
4.4.2.1. Residuo fresco	71
4.4.2.1.1. Efecto letal	71
4.4.2.1.2. Efecto en la reproducción	72
4.4.2.1.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas (residuo fresco sobre sustrato vegetal)	73
4.4.2.2. Residuos envejecidos en invernadero	74
4.5. Discusión	79
 CAPÍTULO V. TOXICIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS POR CONTACTO RESIDUAL SOBRE <i>NESIDIOCORIS TENUI</i>S EN CONDICIONES DE SEMICAMPO	 89
5.1. Introducción	89
5.2. Objetivos	93
5.3. Materiales y métodos	93
5.3.1. Efecto en la mortalidad y la reproducción	93
5.3.2. Efecto en el consumo de presa	95
5.3.3. Evaluación del consumo en presa tratada	97
5.3.4. Análisis de datos	99
5.4. Resultados	101
5.4.1. Efecto letal	101
5.4.2. Efecto en la reproducción	102
5.4.3. Efecto en el consumo de presas	103
5.4.4. Efecto en el consumo en planta tratada	104
5.4.5. Efecto en la respuesta funcional	106
5.4.6. Clasificación toxicológica de los insecticidas	108
5.5. Discusión	110

CAPÍTULO VI. TOXICIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS POR CONTACTO RESIDUAL SOBRE <i>MACROLOPHUS BASICORNIS</i>. COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA SECUENCIAL OILB EN DOS MÍRIDOS DEPREDAORES	117
6.1. Introducción	117
6.2. Objetivos	120
6.3. Materiales y métodos	120
6.3.1. Material vegetal y su manejo	120
6.3.1.1. Plantas de tabaco	120
6.3.1.2. Plantas de tomate	121
6.3.2. <i>Macrolophus basicornis</i>	121
	123
6.3.3. Insecticidas evaluados	123
6.3.4. Contaminación vía residual	124
6.3.4.1. Exposición de adultos a residuo fresco sobre sustrato inerte	124
	130
6.3.4.2. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal. Evaluación de la persistencia	130
6.3.4.3. Exposición de adultos a residuo fresco sobre planta de tomate	131
6.4. Resultados	133
6.4.1. Exposición de adultos a residuo fresco sobre sustrato inerte	133
6.4.2. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal. Evaluación de la persistencia.	136
6.4.3. Exposición de adultos a residuo fresco sobre planta de tomate	139
6.4.4. Comparación de la clasificación de los insecticidas para <i>N. tenuis</i> y <i>M. basicornis</i>	140
6.5. Discusión	144
 CAPÍTULO VII. TOXICIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS SOBRE <i>NESIDIOCORIS TENUIIS</i> TRAS SU ALIMENTACIÓN CON PRESA CONTAMINADA¹	 151
7.1. Introducción	151
7.2. Objetivos	152
7.3. Materiales y métodos	152
7.3.1. Evaluación preliminar del consumo de presa tratada	152
7.3.2. Evaluación de los efectos de los insecticidas vía presa tratada	155
7.3.2.1. Efecto letal	156
7.3.2.2. Evaluación indirecta del consumo	156

7.3.2.3. Efecto en la supervivencia de ninfas	156
7.3.2.4. Efecto en la reproducción	157
7.3.2.5. Efecto en la longevidad	157
7.4. Resultados	157
7.4.1. Evaluación preliminar del consumo de presa tratada	157
7.4.2. Evaluación de los efectos de los insecticidas vía presa tratada	158
7.4.2.1. Efecto letal	159
7.4.2.2. Efectos subletales	161
7.4.2.2.1. Evaluación indirecta del consumo	161
7.4.2.2.2. Efecto en la supervivencia de las ninfas	161
7.4.2.2.2. Efecto en la reproducción	162
7.4.2.2.3. Efecto en la longevidad	164
7.4.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas	171
7.5. Discusión	173
CHAPTER VIII. CONCLUSIONS	179
CAPÍTULO IX. REFERENCIAS	182

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) propone el uso de todas las medidas disponibles para disminuir el crecimiento de las poblaciones plaga, priorizando las actuaciones preventivas y evitando el uso de insecticidas siempre que sea posible. El MIP contribuye al logro de una agricultura más sostenible, basada en el equilibrio entre las necesidades de producción y la conservación de la biodiversidad (Bianchi et al. 2006).

La identificación y uso de insecticidas que no afecten negativamente a los enemigos naturales más relevantes en el control de las plagas es un factor clave del MIP. En este trabajo se estudia el impacto de los insecticidas flubendiamida, flonicamida, metaflumizona, spirotetramat y sulfoxaflor y del control estándar deltametrina en el depredador *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) como especie modelo. Para estimar el impacto por contaminación residual se siguió la metodología secuencial y estandarizada propuesta por la Organización Internacional de Lucha Biología e Integrada (OILB) (Hassan 1987, 1994, Sterk et al. 1999). Para la clasificación final de los productos de acuerdo a las categorías toxicológicas de esta organización, se emplearon dos criterios, **1)** la clasificación del producto para cada parámetro evaluado y la posterior selección del efecto con mayor impacto y **2)** la integración de todos los parámetros evaluados en la fórmula de Efecto Total (Overmeer y van Zon 1982).

La actividad por contacto de los residuos frescos en sustrato inerte se estudió en ninfas N₃ y adultos de *N. tenuis* (mortalidad a las 72 h de exposición y reproducción). Para ambos estados de desarrollo la clasificación final del residuo de deltametrina difirió según el criterio de clasificación utilizado, sin

embargo fueron categorías consecutivas. *Para las ninfas*, deltametrina fue inocuo (categoría OILB 1, efecto con mayor impacto) o ligeramente tóxico (categoría OILB 2, efecto total), mientras que flonicamida, flubendiamida, metaflumizona y spirotetramat, inocuos (categoría OILB 1) y sulfoxaflor, tóxico (categoría OILB 4). *Para los adultos*, deltametrina fue ligeramente tóxico (categoría OILB 2, máxima categoría) o moderadamente tóxico (categoría OILB 3, formula de efecto total), flonicamida, flubendiamida, metaflumizona y spirotetramat, ligeramente tóxicos (categoría OILB 2) y sulfoxaflor, tóxico (categoría OILB 4). Los adultos fueron más susceptibles que las ninfas N₃, por lo que los siguientes ensayos se realizaron sobre el estado adulto del depredador.

La evaluación de la persistencia de los insecticidas se estudió sobre hojas de tomate (mortalidad a las 72 h de exposición y en la reproducción). Utilizando ambos criterios de clasificación, los residuos frescos sobre sustrato vegetal del control estándar (deltametrina), flonicamida, flubendiamida, y spirotetramat fueron clasificados como inocuos (OILB 1), mientras que los residuos de metaflumizona y sulfoxaflor, como tóxicos (OILB 4). Respecto el ensayo de persistencia, metaflumizona y sulfoxaflor continuaron siendo moderadamente tóxicos para el depredador a los 34 días después del tratamiento (DDT) por lo que se clasificaron como productos persistentes (categoría OILB D).

Los **residuos frescos en condiciones de semicampo** se evaluaron con todos los insecticidas independientemente de su clasificación previa porque **1)** la dieta omnívora de *N. tenuis*, planteaba la posibilidad de una doble contaminación (contacto e ingestión) en el caso de que el producto atravesara la capa de ceras foliar y, **2)** porque se amplió la evaluación del efecto en la capacidad benéfica del depredador con un nuevo parámetro, el consumo de presa, de acuerdo con las recomendaciones de la OILB. La *mortalidad* comparada a la del control (1%) se incrementó para sulfoxaflor (80%), metaflumizona (35%) y deltametrina

(29%). No se observó efecto negativo en la *reproducción*; sin embargo los residuos de deltametrina (29%) y flubendiamida (35%) redujeron el *consumo* de la presa. Los modelos de respuesta funcional mostraron que tanto el testigo como deltametrina y spirotetramat mantenían un comportamiento tipo II. La tasa de ataque (a) se redujo respecto del control para los dos tratamientos y además, en el caso de spirotetramat el tiempo de manipulación (T_h) se incrementó. No fue posible obtener modelos de respuesta funcional satisfactorios con los tratamientos de flonicamida, flubendiamida y metaflumizona. La clasificación toxicológica fue la misma para todos los insecticidas independientemente del criterio de clasificación utilizado. Deltametrina, flubendiamida y metaflumizona fueron ligeramente tóxicos (OILB 2), flonicamida y spirotetramat inocuos (OILB 1) y sulfoxaflor tóxico (OILB 4).

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos al aplicar la metodología estándar de la OILB en otro mirido depredador, se evaluó la toxicidad por contacto con el residuo en *Macrolophus basicornis* (Stal) (Hemiptera: Miridae). Este mirido tiene potencial como agente de control biológico en cultivos de tomate en Brasil. Dependiendo de los productos autorizados en Brasil, se evaluaron los mismos insecticidas que en Madrid u otros ingredientes activos con el mismo modo de acción (MoA) (IRAC 2016). Solo en el caso de flonicamida, que no estaba autorizado en Brasil no fue posible encontrar otro producto equivalente. La clasificación toxicológica para el efecto letal de los insecticidas en sustrato inerte (**laboratorio**), hoja (**laboratorio**) y planta de tomate (**semicampo**), fue la siguiente: deltametrina (OILB 2 - 4 - 3), flubendiamida (OILB 1 - 1 - 1), indoxacarb (OILB 3 - 3 - 1), spiromesifén (OILB 1 - 2 - 1), e imidacloprid (OILB 2 - 4 - 4). En cuanto al **ensayo de persistencia**, deltametrina y spiromesifén fueron productos de vida corta (OILB A),

indoxacarb ligeramente persistente (OILB B) e imidacloprid persistente (OILB D).

Al contrastar la clasificación obtenida para los mismos insecticidas o equivalentes por su modo de acción, las mayores discrepancias se obtuvieron en laboratorio, mientras que en semicampo las categorías coincidieron o fueron consecutivas. En esta etapa final de evaluación, los insecticidas con IRAC MoA 28 (flubendiamida) y 23 (spirotetramat y spiromesifén) se clasificaron como inocuos (categoría OILB 1) en ambas especies, y los del grupo IRAC MoA 4 (sulfoxaflor e imidacloprid) como tóxicos (categoría OILB 4). Sin embargo, deltametrina, único representante del grupo IRAC MoA 3, fue más tóxico para *M. basicornis* que para *N. tenuis* y en el caso del grupo 22, *N. tenuis* fue más susceptible a metaflumizona que *M. basicornis* a indoxacarb.

Finalmente, se exploró **el impacto que tienen los insecticidas evaluados vía cadena trófica (presa tratada)**. Durante tres días, ninfas N₃ y adultos de *N. tenuis* se alimentaron con huevos contaminados de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Nuevamente, el estado de desarrollo adulto fue más susceptible que las ninfas. Por esta nueva forma de contaminación, el efecto letal de los insecticidas fue menor que en el caso de la exposición a residuos frescos. Por el contrario, el efecto subletal manifestado en la reproducción fue mayor. Además, la longevidad de los adultos se vio afectada en mayor medida por los insecticidas flonicamida, metaflumizona, spirotetramat y sulfoxaflor en los adultos. La clasificación toxicológica de los insecticidas (laboratorio) fue: *Para ninfas N₃*, deltametrina y spirotetramat fueron inocuos (OILB 1), flonicamida, flubendiamida y metaflumizona ligeramente tóxicos (OILB 2) y sulfoxaflor tuvo una clasificación final diferente según el criterio utilizado, inocuo (1, efecto con mayor impacto) o ligeramente tóxico (categoría 2, formula de efecto total). *Para adultos*, se determinó que deltametrina y spirotetramat

fueron inocuos (categoría OILB 1), flonicamida y flubendiamida ligeramente tóxicos (categoría 2) y nuevamente se observó un cambio en la clasificación final según el criterio utilizado, metaflumizona y sulfoxaflor fueron clasificados como ligeramente tóxicos (categoría OILB 2, efecto con mayor impacto) o como productos moderadamente tóxicos (categoría OILB 3, fórmula de efecto total).

Integrated Pest Management (IPM) proposes to use all available measures to reduce the pest population's growth, giving priority to preventive actions and avoiding the insecticide use whenever possible. IPM contributes to a more sustainable agriculture based on the balance between the production needs and the biodiversity conservation (Bianchi et al. 2006).

The identification and use of selective insecticides without negative impact on the main natural enemies useful in pest control is a key factor in IPM. In this work, the impact of the insecticides flubendiamide, flonicamid, metaflumizone, spirotetramat and sulfoxaflor and the standard control deltamethrin were studied on the predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera Miridae) as a model species. To classify the impact of residual contamination, the sequential and standardized methodology proposed by the International Organization for Biological and Integrated Control (IOBC) (Hassan 1987, 1994, Sterk et al. 1999) was followed. To include the pesticides in the toxicological categories of this organization, two criteria were used, **1)** the classification of every studied parameter and the selection of the worst toxicity class as the final toxicity value and, **2)** the integration of every studied parameter on the Total Effect formula (Overmeer and van Zon 1982).

The residual contact activity of fresh residues on an inert substrate was studied on *N. tenuis* N₃ nymphs and adults (mortality at 72 h after exposure and offspring production). For both life stages deltamethrin was the only pesticide categorized on different toxicity classes even though they were consecutive: *Nymphs*, IOBC category 1, harmless (worst value among the

parameters studied) and, IOBC category 2, slightly toxic (total effect). Flonicamid, flubendiamide, metaflumizone and spirotetramat were harmless (IOBC category 1) and sulfoxaflor toxic (IOBC category 4) irrespective of the criteria used for the classification. *For adults*, deltamethrin was slightly toxic, IOBC category 2, (worst value among the parameters studied) or (IOBC category 3, moderately toxic (total effect). Flonicamid, flubendiamide, metaflumizone and spirotetramat were slightly toxic (IOBC 2) and sulfoxaflor toxic (IOBC 4) irrespective of the criteria used. Adults were more susceptible than N₃ nymphs, so the following tests were only performed on the adult life stage of the predator.

The persistence evaluation of the insecticides was studied on tomato leaves (mortality after 72 h exposure and offspring production). Using the two classification criteria, fresh residues of the standard control (deltamethrin), flonicamid, flubendiamide and spirotetramat were classified as harmless (IOBC 1), while metaflumizone and sulfoxaflor were toxic (IOBC 4). Aged residues of metaflumizone and sulfoxaflor continued to be moderately toxic to the predator at 34 days after treatment (DAT), so both insecticides were classified as persistent (IOBC D).

Fresh residues were evaluated under semifield conditions regardless of the toxic category of the insecticides in the laboratory because **1)** the omnivorous *N. tenuis* diet opened the possibility of a double contamination (contact and ingestion) in case the product was able to cross the layer of leaf waxes and **2)** the assessment of the beneficial capacity of the predator was expanded with a new parameter, the prey intake, according to the IOBC guidelines recommendations. *Mortality* was increased compared to the control (1%) in sulfoxaflor (80%), metaflumizone (35%) and deltamethrin (29%). Not a negative effect on the *offspring production* was observed; however, the *prey consumption*

was reduced in deltamethrin (29%) and flubendiamide (35%). *Functional response* models showed that the control, deltamethrin and spirotetramat fitted a type II. The attack rate (*a*) was reduced by both insecticides and furthermore, the handling time (*Th*) was increased by spirotetramat. It was not possible to obtain satisfactory functional response models for flonicamid, flubendiamide and metaflumizone. The toxicological categories were the same for all insecticides irrespective of the classification criteria used: deltamethrin, flubendiamide and metaflumizone, slightly toxic (IOBC 2), spirotetramat and flonicamid harmless (IOBC 1) and sulfoxaflor, toxic (IOBC 4).

In order to compare the results obtained after the application of the standard IOBC methods, on another mirid predator, the residual contact activity was assessed on *Macrolophus basicornis* (Stal) (Hemiptera: Miridae). This mirid has potential as a biological control agent in Brazilian tomato crops. The same insecticides evaluated on Madrid, if authorized by Brazilian authorities, were studied, or other active ingredients with the same IRAC mode of action (IRAC 2016). Only for flonicamid (not authorized in Brazil), an equivalent active ingredient was not found. The toxicological classification for the lethal effect of the insecticides on an inert substrate (**laboratory**), plant leaf (**laboratory**) and tomato plant (**semifield**) was as follows: deltamethrin (IOBC 2 - 4 - 3), flubendiamide (IOBC 1 - 1 - 1), indoxacarb (IOBC 3 - 3 - 1), spiromesifen (IOBC 1 - 2 - 1) and imidacloprid (IOBC 2 - 4 - 4). On the **persistence assay**, deltamethrin and spiromesifen were short lived products (IOBC A), indoxacarb slightly persistent (IOBC B) and imidacloprid persistent (IOBC D).

Contrasting the classification obtained in similar products according to their mode of action, the main discrepancies were obtained in the laboratory tests, while in semifield, the categories were identical or consecutive. In this final evaluation step, insecticides with IRAC MoA 28 (flubendiamide) and MoA 23

(spirotetramat and spiromesifen) were classified as harmless (IOBC 1) in both species, and those with IRAC MoA 4 (sulfoxaflor and imidacloprid) as toxic (IOBC 4). Deltamethrin, the only representative of the IRAC MoA 3 group was more toxic to *M. basicornis* than to *N. tenuis*, within IRAC MoA 22, *N. tenuis* was more susceptible to metaflumizone than *M. basicornis* to indoxacarb.

Finally, **the impact of insecticides via the food chain (treated prey)** was explored. For three days, *N. tenuis* N₃ nymphs and adults were fed on contaminated eggs of *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Again, the adult life stage was more susceptible than the nymphs. By this new form of contamination, the lethal effect of the insecticides was lower than in the case of exposure to fresh residues. In contrast, the sublethal toxicity (offspring production) was higher. Adult longevity was affected by flonicamid, metaflumizone, spirotetramat and sulfoxaflor. The insecticide toxicological classification (laboratory) for *N₃ nymphs* was: deltamethrin and spirotetramat harmless (IOBC 1), flonicamid, flubendiamide and metaflumizone, slightly toxic (IOBC 2). Sulfoxaflor had a different final classification according to the criteria used: harmless (IOBC 1, worst value among the parameters studied) or slightly toxic (IOBC 2, total effect formula). *For adults*, deltamethrin and spirotetramat were harmless (IOBC 1), flonicamid and flubendiamide, slightly toxic (IOBC 2) and again a different final classification was observed depending on the criteria. Metaflumizone and sulfoxaflor were slightly toxic (IOBC 2, worst value among the parameters studied) or moderately toxic (IOBC 3, total effect formula).

1.1. Manejo Integrado de Plagas

La intensificación de la agricultura ha permitido el incremento del rendimiento de las zonas agrícolas, tanto en la producción de alimentos, fibras y cultivos bioenergéticos (Schreinemachers y Tipraqsa 2012).

Este rápido desarrollo ha contribuido al aumento de las poblaciones plaga en el cultivo, entendiendo como tales a cualquier especie, raza o biotipo vegetal, animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (FAO 2016a, Food and Agricultural Organization). Este incremento es dependiente del uso de plaguicidas, los cuales, junto con el uso de los abonos sintéticos, han tenido efectos negativos en diferentes aspectos, entre los que se encuentra la salud humana. La FAO (2000) señala que el 14% de las enfermedades del sector agrícola de países en desarrollo y el 10% de las muertes pueden ser atribuidos a los insumos agrícolas utilizados en los cultivos. Además, los agroquímicos también pueden reducir la biodiversidad (Hernández y Margalida 2008, Decourtye et al. 2013) y afectar al medio ambiente alterando la calidad del aire, fuentes de agua y tierra utilizable (Horrigán et al. 2002).

Con el fin de disminuir estos problemas, se han propuesto una serie de estrategias en el sector agrícola entre las que se encuentra la implementación del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Según la FAO (2016b), el concepto de MIP hace referencia a la integración de todas las técnicas de control disponibles para el manejo de plagas, priorizando las

medidas preventivas frente a las de control químico, el cual solo se justifica en función de los niveles económicos de daños y cuando no se dispone de otra opción de menor riesgo ambiental. El MIP por tanto, contribuye al logro de una agricultura más sostenible, basada en el equilibrio entre las necesidades de producción y la conservación de la biodiversidad (Bianchi et al. 2006).

Un programa de MIP se desarrolla en las siguientes etapas (FAO 2016c):

1. Prevenir y/o reducir los organismos perjudiciales utilizando estrategias como rotación de cultivos, drenaje equilibrado, protección y mejora de los organismos beneficiosos y cuando sea necesario, suelta de los mismos, elección de variedades resistentes y uso de material de siembra o plantación certificado.
2. Los organismos nocivos se deben muestrear con métodos y herramientas adecuadas.
3. Teniendo en cuenta los resultados del muestreo, se decide cuando aplicar medidas directas de manejo, priorizando el uso de métodos alternativos al control químico como el biológico, físico o etológico (biotecnológico).
4. Los plaguicidas solo deben aplicarse como último recurso y su uso debe ser justificado económicamente (cuando el nivel de plaga supere el umbral de intervención).
5. Los plaguicidas utilizados deben ser lo más selectivos posible y a su vez no deben causar efectos secundarios en la salud humana, los organismos no objetivo y el medio ambiente.
6. Finalmente, se debe evaluar la eficacia de las medidas aplicadas para el control de plagas.

Con el fin de disminuir el uso de plaguicidas, la aplicación de los principios de MIP está recomendada en Estados Unidos desde 1996 (EPA 2015) y es de obligado cumplimiento en la Unión Europea (OJEU 2009), habiéndose iniciado su vigencia a partir del 1 de Enero del 2014. Dicha directiva ha sido transpuesta en España a través del Real Decreto 1311/2012 (BOE 2012).

Aunque uno de los pilares del MIP es priorizar el uso de estrategias de control no químicas, actualmente el uso de plaguicidas todavía es la herramienta de control de plagas más utilizada en la mayoría de los agrosistemas (Wilson y Tildell 2001, Schreinemachers y Tipraqsa 2012). No obstante, desde la década de los noventa se inició el reemplazo de los primeros plaguicidas de síntesis por otros de mejor perfil ambiental. En el caso de los insecticidas y acaricidas, los productos de segunda generación (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides), caracterizados por su amplio espectro de actividad y por su persistencia (Casida y Quistad 1998), se están sustituyendo progresivamente por otros productos con nuevos modos de acción, en general más selectivos y degradables (EPA 2016a, MAGRAMA 2016a).

Hoy en día se reconocen moléculas con propiedades insecticidas y acaricidas englobadas en 53 subgrupos químicos, que a su vez pertenecen a 27 grupos de diferente modo de acción, además de un grupo en el que se incluyen los insecticidas de modo de acción desconocido. No obstante, el grupo de los organofosforados (65 ingredientes activos), seguido por los piretroides (44 ingredientes activos) y carbamatos (26 ingredientes activos) continúan liderando el mercado mundial (IRAC 2016).

Como se dijo anteriormente, el control biológico es una estrategia fundamental en el MIP (Medina 2008, Zalom et al. 2010). A lo largo del tiempo se ha definido de diferentes formas; la EPA (2016b) (por sus siglas en inglés Environmental Protection Agency) la define actualmente como el uso de organismos que se alimentan de organismos plaga. Más enfocado al control biológico de artrópodos, DeBach (1964) lo definió como el estudio y uso de parásitos, depredadores y patógenos para la regulación de densidades de poblaciones plaga.

Existen diferentes tipos de control biológico (Bale et al. 2008):

- 1. Control biológico clásico:** utilizado principalmente contra especies plaga invasoras. Consiste en la importación y liberación de agentes de control biológico provenientes del lugar de origen de las plagas con el fin de que se establezcan y controlen a largo plazo a la plaga.
- 2. Control biológico aumentativo:** se puede distinguir entre "inoculación periódica" o inoculativo e "inundativo". Esta estrategia se refiere a la liberación de enemigos naturales en el cultivo que usualmente requieren de producciones comerciales para su disponibilidad. El objetivo de una liberación inundativa es crear una proporción favorable del enemigo natural para producir una rápida reducción o extinción local de la plaga. La liberación inoculativa persigue un control a medio plazo basado en la descendencia de los agentes de control biológico liberados.
- 3. Control biológico por conservación:** se basa en manipular el agrosistema para crear un ambiente favorable, aumentando la abundancia y actividad de los enemigos naturales de la zona donde se está realizando el control, con medidas como la manipulación del

microclima en el cultivo, la creación de refugios, el incremento en la disponibilidad de presas y/o hospederos alternativos, el uso de plaguicidas selectivos, etc.

Hoy en día, el uso conjunto del control biológico y químico es una realidad necesaria en un contexto de MIP (Medina et al. 2008); en los cultivos coexisten siempre varias plagas por lo que el uso combinado de los controles químico y biológico logra una mayor eficacia que si se aplican de forma independiente (Gentz et al. 2010, Garzón et al. 2015). Para lograr la aplicación conjunta de plaguicidas y enemigos naturales, es indispensable evaluar su compatibilidad. En general, los insecticidas y acaricidas modernos son más selectivos con la fauna auxiliar, pero raramente son compatibles con todos los grupos de enemigos naturales por lo que es necesario realizar estudios de efectos secundarios caso por caso (Arnó y Gabarra 2011, Biondi et al. 2012).

1.2. Evaluación de la compatibilidad entre el control químico y el biológico

De acuerdo con Guedes et al. (2016) se pueden distinguir tres niveles para analizar el estrés provocado por los insecticidas sobre los artrópodos: *1) en el individuo*, se evalúan los cambios fisiológicos o en el comportamiento; *2) en la población*, una aproximación demográfica empleando herramientas como las tablas de vida; y *3) en la comunidad*, se realizan estudios ambientales que están enfocados a más de una especie.

El análisis del impacto de los plaguicidas en la población o en la comunidad es un estudio más completo que en el nivel de individuo y podría representar con más fidelidad lo que ocurre en condiciones reales. Sin embargo, la ejecución e interpretación de los resultados de este tipo de

ensayos puede ser muy complicada, por lo que la mayoría de las evaluaciones del impacto de los plaguicidas en los enemigos naturales se plantean en el primer nivel, con una pequeña representación de la especie a estudiar.

Dentro de este último nivel, existen diferentes métodos de evaluación para establecer la compatibilidad entre productos fitosanitarios y enemigos naturales. Uno de ellos consiste en comparar la susceptibilidad frente al plaguicida del auxiliar y de la plaga. Para ello se calcula la proporción entre las CL_{50} o DL_{50} (concentración o dosis letal para el 50% de la población) en un agente de control y en la especie plaga (Stark et al. 2007). Sin embargo, esta metodología solo contempla la mortalidad.

Uno de los métodos más utilizados en este tipo de estudios es el propuesto por el grupo de trabajo “Plaguicidas y Organismos Benéficos” de la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB), el cual consiste en la exposición al plaguicida aplicado a la máxima dosis o concentración recomendada en campo, siguiendo métodos estandarizados y un sistema secuencial que reduce progresivamente la exposición al plaguicida, en donde el primer nivel consiste en una fase de laboratorio, seguida por una segunda fase desarrollada en condiciones de semicampo y terminando en pruebas de campo. Según el incremento en la mortalidad o la disminución en la capacidad benéfica, los productos se clasifican en cuatro categorías: inocuo (1), ligeramente tóxico (2), moderadamente tóxico (3) y tóxico (4); si un plaguicida es considerado inocuo en las fases 1 o incluso 2, no necesita continuar con la evaluación de las siguientes fases (Sterk et al. 1999).

En el presente trabajo se ha seguido esta metodología secuencial debido a que los resultados provenientes de trabajos con un sistema de evaluación

homogéneo son más fáciles de comparar y/o extrapolar entre ellos (Samsøe-Petersen 1990) y actualmente es utilizada por técnicos y agricultores (Agrobio 2016a, Koppert 2016). Una cuestión que se debate en la actualidad, y que se ha planteado en esta tesis (capítulo VI), es hasta que punto se puede generalizar la clasificación toxicológica conocida de un plaguicida moderno, con un perfil más selectivo que los tradicionales. Algunos trabajos sugieren la necesidad de estudiar caso por caso (Arnó and Gabara (2011), pero sin duda, la posibilidad de aplicar la información disponible, a productos similares por su modo de acción y/o a especies filogenéticamente próximas, simplificaría la toma de decisiones en programas de manejo integrado de plagas o en estrategias de control biológico de conservación.

1.2.1. Rutas de contaminación

La toxicidad de muchos insecticidas depende principalmente de la ruta de exposición (Stark et al. 1995). Según Croft (1990), la toxicidad está causada por (**Figura 1**):

- **Contacto directo:** cuando la aplicación del producto coincide con la presencia del enemigo natural y su contacto es con las gotas del producto o la inhalación de los vapores.
- **Contacto residual:** ocurre cuando el enemigo natural entra en contacto con los residuos del producto que permanecen sobre una superficie previamente tratada.

- **Ingestión de alimento contaminado:** en este caso, el enemigo natural se contamina tras alimentarse de la presa o planta que previamente han estado en contacto con el insecticida.

La importancia de estas rutas de exposición depende de factores como las propiedades intrínsecas de los plaguicidas, por ejemplo, su mayor o menor acción por contacto o ingestión, si los compuestos tienen actividad sistémica, etc y de las características biológicas y ecológicas del enemigo natural, por ejemplo, si se trata de un parasitoide o un depredador. Para Croft (1990) las formas más frecuentes de contaminación de los depredadores en los cultivos son la exposición a residuos y la ingestión de alimento contaminado.

Figura 1 Rutas de contaminación de los insectos en cultivos agrícolas. a) Contaminación directa. b) Contaminación residual. c) Contaminación por ingestión.

1.2.2. Tipos de efectos en agentes benéficos

Adicionalmente, cada producto puede ocasionar diferentes efectos en los artrópodos:

1.2.2.1. Efecto letal y subletal

El **efecto letal** corresponde a la mortalidad aguda o causada en un corto periodo de tiempo de exposición (24 - 72 h) (Ruberson et al. 1998). La

mayoría de los estudios de ecotoxicología en enemigos naturales se centran en el efecto letal (Desneux et al. 2007, Guedes et al. 2016).

Los **efectos subletales** se definen como cambios en la biología o en el comportamiento de los individuos que han sobrevivido a la exposición del producto (Lee 2000, Desneux et al. 2007, Talebi et al. 2008). Se han descrito numerosos efectos subletales de los plaguicidas en distintos agentes benéficos, los cuales pueden comprometer su eficiencia como reguladores de las poblaciones plaga. Lee (2000) y Desneux et al. (2007) describen ampliamente los efectos negativos causados sobre diferentes enemigos naturales en el desarrollo, longevidad, inmunología, proporción sexual, fecundidad, fertilidad y los que se manifiestan en un cambio del comportamiento del enemigo natural, por ejemplo, en la reducción de su movilidad, capacidad de orientación, alimentación o aprendizaje.

1.2.2.2. Efecto total

Para combinar todos los efectos de un plaguicida evaluados (letales y subletales), en una sola categoría de toxicidad se puede utilizar la fórmula de Efecto Total (*ET*) (Talebi et al. 2008).

En la **Tabla 1** se presenta una revisión bibliográfica de las fórmulas de efecto total utilizadas en diferentes agentes de control. La primera fue la empleada en el trabajo de Overmeer y van Zon (1982), en la que se integró el efecto letal (incremento de mortalidad respecto al control) y el efecto en la fecundidad (reducción) y a la que posteriormente se han incorporado diferentes parámetros como reducción de la fertilidad o de la supervivencia.

Tabla 1 Estudios en los que se ha evaluado el Efecto Total de insecticidas sobre enemigos naturales.

Citas	Fórmula de ET utilizada
1, 2, 3, 4, 5, 6,7	$E = 100 - (100 - M) \times R_1$
8	$E = M \times R_1 \times R_2 \times R_3$
9,10,11	$E = 100 - (100 - M) \times R_1 \times R_2$
12	$E = 100 - [1 - (R_1 \times R_2 \times R_3 \times R_4)]$

M: incremento de la mortalidad, **R₁:** reducción de la fecundidad o tasa de oviposición, **R₂:** Reducción de la fertilidad o tasa de nacimientos, **R₃:** reducción de la supervivencia de adultos, **R₃:** reducción de la supervivencia de adultos, **R₄:** reducción de la supervivencia de inmaduros.

Citas: 1) Overmeer y Van Zon (1982); 2) Vogt et al. (2000); 3) van de Veire et al. (2002); 4) Talebi et al. (2008); 5) Pozzebon et al. (2010); 6) Arnó y Gabarra (2011); 7) Moscardini et al. (2013); 8) Urbaneja et al. (2008); 9) Moura et al. (2012); 10) Silva et al. (2012); 11) Castilhos et al. (2014); 12) Planes et al. (2012).

1.3. *Nesidiocoris tenuis*

1.3.1. Sistemática

La sistemática de *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) que se cita a continuación está basada en la clasificación de Fauna Europaea (2016a).

CLASE: Insecta

ORDEN: Hemiptera

SUBORDEN: Heteroptera

INFRAORDEN: Cimicomorpha

SUPERFAMILIA: Miroidea

FAMILIA: Miridae

SUBFAMILIA: Bryocorinae

TRIBU: Dicyphini

GÉNERO: *Nesidiocoris*

ESPECIE: *Nesidiocoris tenuis* (Reuter 1895)

1.3.2. Descripción y biología

1.3.2.1. Ciclo de vida

El desarrollo de este depredador, como el de todas las especies que pertenecen al suborden Heteroptera, es heterometábolo, comprendiendo tres estados de desarrollo: huevo, ninfa (cinco estadios) y adulto (**Figura 2**). Las características de cada estado de desarrollo son (El Dessouki et al. 1976):

- Las hembras insertan los huevos (< 1 mm) en el interior del tejido vegetal, prefiriendo la epidermis de los tallos y nervios foliares, dejando a la vista solamente la lígula (apéndice respiratorio). Aunque este apéndice no es muy notorio, a medida que el huevo va madurando se aprecia un poco más en el exterior del tejido vegetal hasta su eclosión, cuando nace la ninfa.

- El periodo de ninfa consta de cinco estadios (1 – 2,6 mm). En el primer y segundo estadio, las ninfas son semitransparentes o de un color verde muy claro. En el tercer estadio los esbozos alares comienzan a ser visibles, mientras que en el cuarto y quinto estadio, los esbozos alares son muy notables y se extienden hasta el segundo-tercer (N_4) o el cuarto (N_5) segmento abdominal. El tono de la superficie dorsal del tórax es cada vez más brillante.

- El estado adulto (3 - 4 mm) se diferencia de otras especies ibéricas del mismo género por las manchas o bandas negras presentes en las alas y antenas (a modo de anillado) que sobresalen de la coloración verde del cuerpo; adicionalmente tiene un anillo de color negro que rodea la cabeza. Presenta un dimorfismo sexual muy marcado (**Figuras 3 y 4**). Los machos se diferencian de las hembras con un punto negro en la zona genital mientras que las hembras presentan una genitalia con forma de T invertida. El abdomen de la hembra es más grueso y con forma de trípode y el del macho es estrecho y liso.

Figura 2 Detalle del ciclo biológico de *Nesidiocoris tenuis* sobre tomate a 25°C y 75% HR (Calvo y Urbaneja 2003).

Figura 3 Diagrama del dimorfismo sexual de *Nesidiocoris tenuis*. Hembra vista ventral (a) y lateral (c) y macho vista ventral (b) y lateral (d).

Figura 4 Detalle del dimorfismo sexual de *Nesidiocoris tenuis* (Téllez y Tapia 2006).

1.3.2.2. Hábitos de alimentación

Los míridos (Hemiptera: Miridae) están considerados principalmente como un grupo que engloba especies fitófagas, entre las que se incluyen diversas plagas agrícolas. Sin embargo, muchas de sus especies tienen una dieta zoofitófaga y su interés como agentes de control biológico es cada vez mayor (Lucas y Alomar 2002, Urbaneja et al. 2005, Arnó et al. 2010).

En el caso de *N. tenuis*, su alimentación omnívora ha sido objeto de diversos estudios. Las ninfas de primeros estadios son fundamentalmente fitófagas pero a medida que avanza su desarrollo se convierten en voraces depredadores, utilizando la planta solo como fuente de líquido y en el estado de adulto también como sustrato para la oviposición (De Puyseleir et al. 2012). En el cultivo del tomate *N. tenuis* puede producir anillos necróticos en el tejido vegetal como consecuencia de su alimentación de los fluidos (Calvo y Urbaneja 2003). A pesar de ello, Urbaneja et al. (2005) indican que este depredador no es capaz de completar su ciclo biológico con una dieta estrictamente fitófaga en los cultivos de berenjena, pepino y tomate. Sánchez (2008), observó a nivel de campo que *N. tenuis* presentaba una dinámica poblacional típica de un depredador en el cultivo de tomate, porque su número se incrementaba y se reducía correlativamente a las densidades de la presa. Estos resultados

sugieren que este mívrido explota los recursos de la planta solo cuando las presas son escasas, pudiendo en este caso comportarse como plaga y producir daños en el cultivo (Calvo et al. 2009).

Se consideran depredadores generalistas ya que pueden alimentarse de diferentes especies como moscas blancas, trips, araña roja, pulgones, ácaros, huevos y larvas neonatas de lepidópteros (Jacas y Urbaneja 2008, Urbaneja et al. 2003).

1.3.2.3. Comportamiento en la reproducción

La hembra de *N. tenuis* tiene un apareamiento múltiple (Franco 2010), comportamiento ampliamente extendido en insectos, porque la hembra al copular con varios individuos reduce el riesgo de aparearse con machos estériles o genéticamente incompatibles (Fedorka y Mouseau 2002). Aunque el cortejo en mívridos puede ser relativamente elaborado (El Desouki et al. 1976), según Franco (2010), las hembras de *N. tenuis* aceptan con facilidad a los machos para aparearse hasta cinco veces consecutivas sin necesidad de contacto previo (pero con un periodo refractario o de descanso de 24 h), pues apenas se encuentran en la arena experimental pueden iniciar la cópula teniendo una duración aproximada de 3 h.

Para dar inicio a la cópula, los machos se ubican al lado derecho de la hembra y una vez la pareja está acoplada, el macho gira 180° (Franco 2010). Aunque las hembras de los mívridos no tienen una espermateca funcional, en su lugar presentan un depósito seminal, que tras recibir el esperma del macho lo envía a los conductos genitales, las ovariolas (Hinton 1962). En el caso de *N. tenuis* el transporte del 100% del semen se realiza en un periodo de 1 h (Franco 2010).

1.3.3. Distribución

Aunque *N. tenuis* se conoce como una especie endémica de la Cuenca Mediterránea (**Figura 5**), también se ha citado en el norte de África, Japón, Australia, Islas del Pacífico, Norteamérica, Cuba, Venezuela (Kerzhner y Josifov 1999, Zappala et al. 2013), Colombia (Valderrama et al. 2007) e Irán (Linnavuori 2007).

En España aparece de forma espontánea en cultivos hortícolas protegidos de la zona del litoral Mediterráneo e Islas Canarias, encontrándose principalmente sobre solanáceas (Calvo y Urbaneja 2003, 2004, Téllez y Tapia 2006, Castañé et al. 2011); por esta razón los programas de MIP con *N. tenuis* contemplan el control biológico de conservación en esta zona (Moreno-Ripoll et al. 2012).

Figura 5 Distribución geográfica de *Nesidiocoris tenuis* en Europa (Fauna Europaea 2016 b).

1.3.4. Importancia como agente de control biológico

Nesidiocoris tenuis se utiliza en cultivos hortícolas, principalmente en tomate [*Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae)], para el control de las moscas blancas [*Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum*

(Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae)] y de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), aunque su contribución en la regulación de plagas secundarias como trips, pulgones y ácaros es reconocida (Sánchez y Lacasa 2008, Calvo et al. 2009, Urbaneja et al. 2009).

Las estrategias de control biológico utilizadas son la de conservación para incrementar su presencia espontánea en los cultivos y liberaciones inoculativas (Arnó y Gabarra 2011). La comercialización del depredador se realiza en botes de 500 adultos y ninfas N₅ mezclados (Agrobio 2016b, Koppert 2016).

La introducción de los individuos puede seguir dos criterios, **1) *Postransplante***: la suelta se realiza en las primeras semanas del cultivo (3 o 4 semanas del transplante), escogiendo entre 20 a 25 puntos de suelta en zonas con presencia de presa. En el caso de tener una baja densidad de la población de insectos plaga, se sugiere añadir una presa alternativa [huevos de *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)] para mantener la supervivencia de ninfas y adultos del depredador en el cultivo (Robledo et al. 2009, Koppert 2016b). **2) *Pretransplante***: debido a que el desarrollo de *N. tenuis* es más lento que el de algunas plagas, otra forma posible y recientemente puesta en punto, consiste en la suelta de hembras de *N. tenuis* en las plántulas del semillero (alimentadas con huevos de *E. kuehniella* para mantener la calidad de la puesta), de forma que al realizar el transplante al invernadero comercial, las ninfas estén establecidas desde el inicio del ciclo productivo del cultivo (Urbaneja et al. 2009, Calvo et al. 2010, Calvo et al. 2012).

1.4. Insecticidas evaluados

Los productos utilizados en este trabajo se seleccionaron por estar registrados en el cultivo de tomate en los países de España (MAGRAMA 2016a) y/o Brasil* (MAPA 2016), con la excepción de sulfoxaflor, que aunque ha sido recientemente incluido en el anexo I de la Directiva Europea 91/414/CEE (OJEU 2015) todavía no se ha autorizado su uso en España. Sí se emplea en otros países como Colombia desde el 2012 (ANLA 2013), Australia (APVMA 2016) y EE.UU. desde el 2013 (EPA 2013) hasta 2015 (EPA 2016c) y Canadá desde 2016 (PMRA 2016).

Las características generales de las materias activas utilizadas en este trabajo se describen a continuación. Las características específicas de los productos comerciales utilizados se muestran en la **Tabla 2**.

1.4.1. Deltametrina

Deltametrina pertenece al mayor grupo de insecticidas neurotóxicos, los piretroides. Fue descrito por primera vez en 1974 (Davies et al. 2007). Se seleccionó como control estándar en base a su toxicidad en otros enemigos naturales, en particular en el mirido *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). Para esta especie, se considera un producto tóxico (categoría OILB 4) para las ninfas y los adultos y ligeramente persistente (Koppert 2016c).

Según la clasificación de IRAC (2016) este compuesto pertenece al subgrupo 3A: moduladores del canal de sodio (piretroides). Cuando entra en contacto con el insecto, se mantienen abiertos los canales de sodio de

*Los productos registrados en Brasil han sido utilizados para los ensayos sobre *M. basicornis* solamente en el capítulo VI.

las células presinápticas, causando hiperexcitación y en algunos casos bloqueo nervioso (de Liñán 2016).

Es poco residual y presenta una ligera actividad repelente (de Liñán 2016). Actúa por contacto e ingestión, tiene un elevado efecto de choque y carece de propiedades sistémicas (Tomlin 2009). Los productos comerciales utilizados fueron: Decis Protech®: con 3 a 4 tratamientos por campaña y un plazo de seguridad de tres días en España (MAGRAMA 2016b) y Decis® 25: con un plazo de seguridad de 3 días en Brasil (Agrofit 2016a).

1.4.2. Flonicamida

Este producto se describe por primera vez en el año 2000 (Tomlin 2009). De acuerdo con IRAC (2016) pertenece al grupo 29: moduladores de los órganos cordotonales. Se trata de un modo de acción todavía sin definir por completo, pues no se conoce el sitio específico de unión en las células diana. Sin embargo, afecta al sistema nervioso central bloqueando los canales de potasio, lo que conduce a una liberación no controlada de neurotransmisores, que se traduce a su vez en la inhibición de la alimentación.

Actúa por contacto e ingestión (Morita et al. 2007, de Liñán 2016) y tiene propiedades sistémicas y translaminares (Tomlin 2009). En España, el producto comercial utilizado (Teppeki®) se aplica por pulverización con un intervalo mínimo de 7 días entre aplicaciones. Su plazo de seguridad en el cultivo del tomate es de un día (MAGRAMA 2016c).

1.4.3. Flubendiamida

Insecticida perteneciente al grupo de las diamidas, descrito por primera vez en 2005. Debido a su reciente descubrimiento y al poco conocimiento que se tiene todavía sobre ~~en~~ su modo de acción, IRAC (2016) ha creado un nuevo grupo, el 28: moduladores del receptor de la rianodina ya que activa los canales rianodínicos intracelulares (receptores de la rianodina) que se encargan de la liberación de calcio de los insectos en el proceso de contracción muscular. Al permanecer abiertos estos canales se produce la liberación incontrolada de calcio, lo que provoca contracción, parálisis (Kato et al. 2009), cese de la alimentación, regurgitación y letargo (Lahm et al. 2009).

Es un insecticida que muestra actividad por ingestión y es selectivo para el orden Lepidoptera. Carece de propiedades sistémicas. Se utilizaron dos productos comerciales. En España Fenos®, en el cultivo de tomate, se recomienda un máximo de dos aplicaciones en pulverización por ciclo (7 días de intervalo) y tiene un solo día de plazo de seguridad en España (MAGRAMA 2016d). En Brasil se utilizó Belt®, recomendado contra *T. absoluta* y *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). Se pueden realizar un máximo de cuatro aplicaciones por ciclo de cultivo manteniendo un plazo de seguridad de 7 días (Agrofit 2016b).

1.4.4. Imidacloprid

Según la clasificación IRAC (2016), pertenece al subgrupo 4A: agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) (neonicotinoides). Tras su activación, se bloquean los impulsos nerviosos en los receptores postsinápticos, lo que resulta en el cese de la alimentación, parálisis y

muerte de los insectos. Sobre adultos de mosca blanca (*T. vaporariorum* y *B. tabaci*) tiene actividad repelente.

Este insecticida actúa por contacto e ingestión y es absorbido tanto por vía radicular como por el tejido vegetal, por lo que se puede aplicar al suelo, semillas y sobre las hojas del cultivo (de Liñán 2016). En Brasil, el producto comercial utilizado en este ensayo (Provado®) se utiliza específicamente contra pulgones [*Myzus persicae* Sulzer, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphilidae)], *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) y *B. tabaci* con un máximo cinco aplicaciones por ciclo de cultivo y un intervalo de 4 días entre ellos. El plazo de seguridad es de 7 días (Agrofit 2016c).

1.4.5. Indoxacarb

Se encuentra dentro del subgrupo 22A: bloqueadores del canal de sodio dependiente del voltaje (oxadiazinas) (IRAC 2016). Para observar los síntomas de neurointoxicación, baja coordinación en movimientos, parálisis y muerte de los insectos (Wing et al. 2000, 2004).

Tiene actividad insecticida por ingestión y más lentamente por contacto y carece de propiedades sistémicas. Según Agrofit (2016d) en Brasil el producto comercial Rumo® se utiliza contra larvas de diferentes lepidópteros. Es utilizado contra los lepidópteros *N. elegantalis*, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidopera: Noctuidae) y *T. absoluta* en el cultivo de tomate, con un plazo de seguridad de un día y un máximo de 7 aplicaciones por ciclo de cultivo.

1.4.6. Metaflumizona

Es un insecticida presentado a la comunidad científica en 2007 (Takagi et al. 2007). De acuerdo con la clasificación propuesta por IRAC (2016) se incluye en el subgrupo 22B: bloqueadores del canal de sodio dependiente del voltaje (semicarbazonas), hace que el insecto convulsione por la activación de los receptores sensoriales, causando parálisis total, seguida del cese de la alimentación (de Liñán 2016, Salgado y Hayashi 2007, Casida y Durkin 2013).

Actúa principalmente por ingestión, aunque tiene una moderada actividad por contacto. No tiene propiedades sistémicas, pero tiene un limitado movimiento translaminar (BASF 2007). En España el uso del producto comercial Alverde® se autorizó temporalmente en 2009, para combatir a la plaga *T. absoluta* o polilla del tomate. Actualmente, se recomienda para el control de plagas de lepidópteros [*Heliothis* sp, *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Noctuidae) y *T. absoluta*], con un máximo de dos aplicaciones (en pulverización) por campaña y un intervalo de 7 días entre ellas. Su plazo de seguridad es de 3 días (MAGRAMA 2016e).

1.4.7. Spiromesifén

Este insecticida y acaricida fue descubierto en los años 90 (Bretschneider et al. 2005). La clasificación de IRAC (2016) lo ha incluido en el grupo 23: inhibidores de la acetil CoA carboxilasa, aunque no se ha identificado la proteína que es responsable del efecto biológico que produce. Esta materia activa afecta a la biosíntesis de lípidos necesarios para el desarrollo y fecundidad de los insectos (Tomlin 2009).

Su modo de acción principal es por contacto, aunque también alguna cantidad del insecticida puede penetrar dentro del tejido foliar (Marčić et al. 2011). En Brasil, el producto comercial Oberon® se recomienda aplicar el producto contra las plagas *T. urticae* y *B. tabaci* con un plazo de seguridad de 3 con un máximo 4 aplicaciones por ciclo de cultivo (Agrofit 2016d).

1.4.8. Spirotetramat

Este insecticida y acaricida se presenta por primera vez en 2006. Pertenece al grupo IRAC 23: inhibidores de la acetil CoA carboxilasa (IRAC 2016), e impide la síntesis de lípidos necesarios para el desarrollo de los insectos (Tomlin 2009). Es un producto sistémico y después de ser absorbido por la planta, se transforma en su metabolito (BYI08330-enol), que es la forma activa (Salazar-López et al. 2016).

Actúa principalmente por ingestión y ligeramente por contacto, pudiendo tener efectos en la fecundidad de los adultos, al igual que en estados inmaduros de desarrollo como larvas y huevos (Brück et al. 2009, Tomlin 2009). Afecta especialmente a insectos chupadores en las primeras fases de su desarrollo (Nauen et al. 2008). El producto Movento® (MAGRAMA 2016f) está autorizado en España para el control de insectos chupadores como los homópteros y los tisanópteros. En el cultivo de tomate se utiliza contra mosca blanca (*B. tabaci* y *T. vaporariorum*) y contra pulgones con un máximo de 4 aplicaciones por campaña, con intervalos de 7 días. Tienen 3 días de plazo de seguridad.

1.4.9. Sulfoxaflor

De acuerdo a la clasificación de IRAC (2016) se encuentra en el subgrupo 4C: agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) (sulfoxaminas). Imita la acción de la acetilcolina en el receptor, provocando una hiperexcitación del sistema nervioso central. Además, presenta una relación estructura-actividad distinta al resto de agonistas del nAChR (Sparks et al. 2013). Se ha comprobado su eficacia en numerosos insectos chupadores, comparándose con la de los neonicotinoides (Babcock et al. 2011).

Este insecticida actúa tanto por contacto como por ingestión y posee movimiento sistémico (Babcock et al. 2011, Zhu et al. 2011, APMVA 2013). El compuesto utilizado en este trabajo aun no es un producto comercial en España, pero sí en otros países.

Tabla 2 Características principales de los insecticidas evaluados.

Modo de acción (IRAC) ¹	Ingrediente activo (i.a.)	Producto comercial	Casa comercial	Concentración (mg i.a./l) ²	Plaga objetivo en el cultivo de tomate
Modulador del canal de sodio	Deltametrina	Decis Protech®/ 1,5% EW	Bayer S.L.	12,5	Lepidópteros- dípteros hemípteros-tisanópteros
	Deltametrina ³	Decis 25®/ 1,5% EC	Bayer S.A.	12,5	
Modulador de los órganos cordotonaes	Flonicamida	Teppeki®/ 50% WG	Crop Protection	60	Hemípteros
Modulador del receptor de rianodina	Flubendiamida	Fenos®/ 24% WG	Bayer S.L.	60	Lepidópteros
	Flubendiamida ³	Belt®/ 48% SC	Bayer S.A.	240	
Boqueador del canal de sódio dependiente de voltaje	Metaflumizona	Alverde®/ 24% SC	Basf S.A.	240	Hemípteros-lepidópteros
	Indoxacarb ³	Rumo®/30% WG	DuPont	48	Lepidópteros
Inhibidor de acetil CoA carboxilasa	Spirotetramat	Movento 150 Q-TEC®/15% OD	Bayer S.L.	75	Hemípteros-tisanópteros
	Spiromesifen ³	Oberon®/ 24% OD	Bayer S.A.	240	Ácaros-hemípteros
Agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina	Sulfoxaflor	Producto no comercial	Dow Agrosience	60*	-
	Imidacloprid ³	Provado®/ 20% SC	Bayer S.A	100	Hemípteros-tisanópteros

¹IRAC: Insecticide Resistance Action Committee; ²MCRC: máxima concentración recomendada en el cultivo. EW: Emulsión de aceite en agua, WG: Granulado dispersable en agua, SC: Suspensión concentrada y OD: Dispersión oleosa. ³Productos utilizados solo para los ensayos del capítulo VI sobre *M. basicornis*. *Dosis recomendada por la casa comercial.

La agricultura sostenible se basa en el equilibrio entre las necesidades de producción y la conservación de la biodiversidad. En este contexto, el Manejo Integrado de Plagas (MIP) racionaliza el uso de los productos fitosanitarios, sustituyéndolos cuando es posible por otras medidas de control o dando prioridad a plaguicidas más selectivos.

- El objetivo general de este trabajo es la identificación de la **compatibilidad** de cinco modernos insecticidas (flonicamida, flubendiamida, metaflumizona, spirotetramat, sulfoxaflor) y un compuesto estándar (deltametrina) con el **depredador *N. tenuis***, enemigo natural clave en el cultivo del tomate en España. Para ello, se aplican las recomendaciones de la OILB en la evaluación de los efectos letal y subletales considerados. De igual forma, se estudia la toxicidad de los mismos insecticidas u otros homólogos por su modo de acción, en el **depredador *M. basicornis***.

Los objetivos específicos planteados en *N. tenuis* son:

- Comparar la susceptibilidad de las **ninfas de tercer estadio** y los **adultos del depredador** expuestos a los **residuos frescos** de los insecticidas en condiciones de máxima exposición (**sustrato inerte**) y establecer el estado de desarrollo más susceptible o el más tolerante.

- Evaluar la **persistencia** de los insecticidas estudiados mediante la exposición a **residuos degradados en condiciones de invernadero**, utilizando la metodología de laboratorio extendido (hoja de tomate).
- Estimar el impacto causado por los insecticidas en la **mortalidad, consumo, tipo de respuesta funcional y reproducción** de *N. tenuis* al estar en contacto con el **residuo fresco** sobre planta en condiciones de **semicampo**.
- Conocer el impacto causado por la **contaminación vía presa tratada** en la **mortalidad, supervivencia de ninfas, reproducción y longevidad** de *N. tenuis* cuando **ninfas y adultos** del depredador se alimentan de presas tratadas con los diferentes insecticidas.

Los objetivos específicos planteados en *M. basicornis* son:

- Evaluar la toxicidad de cinco insecticidas, deltametrina, flubendiamida, indoxacarb, spiromesifén e imidacloprid en adultos del depredador, mediante la exposición al **residuo fresco** en condiciones de **laboratorio y semicampo**, junto con ensayos de **persistencia** con residuos degradados bajo condiciones de invernadero.
- **Comparar los resultados de la clasificación de los insecticidas** iguales u homólogos, evaluados en España y en Brasil siguiendo el **método normalizado** propuesto por la OILB en las dos especies de miridos *N. tenuis* y *M. basicornis*.

Capítulo III. Materiales y métodos generales

En este capítulo se describen los materiales y métodos generales aplicados en los distintos ensayos de este trabajo. La descripción más detallada de cada ensayo se amplía en el capítulo correspondiente.

3.1. Descripción de los lugares de los ensayos

Todos los estudios descritos en el presente trabajo se llevaron a cabo en las instalaciones de la Unidad de Protección de Cultivos perteneciente a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (E.T.S.I.A.A.B.) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), a excepción de los realizados con el depredador *M. basicornis*, los cuales tuvieron lugar en el Laboratorio de Selectividad del Departamento de Entomología perteneciente a la Universidad Federal de Lavras (UFLA) (Minas Gerais, Brasil). La descripción de las condiciones de este laboratorio se ha incluido en el capítulo VI.

3.1.1. Condiciones de laboratorio

Para la cría de los insectos y la realización de los ensayos de laboratorio y laboratorio extendido se utilizó una cámara visitable o insectario (**Figura 6**) de 4,25 m de largo, 2 m de ancho y 2,5 m de altura, cuyas condiciones ambientales fueron: temperatura: $25 \pm 2^\circ \text{C}$, humedad relativa del aire (HR): $75 \pm 5 \%$ y fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Figura 6 insectario. a) Lado izquierdo y b) derecho del insectario respecto la puerta de entrada

Para permitir la renovación del aire y evitar variaciones bruscas de la temperatura, la cámara incluía un equipo de ventilación y calefacción (Interclisa®, modelo CUCV026M3-CXE026M3), regulado por un termostato (Sunvic®). Mediante un higrostatto conectado a un humidificador (Defensor®, modelo 505) se reguló el porcentaje de humedad. Además, un termohigrómetro digital con memoria de niveles máximos y mínimos verificaba el mantenimiento de estas condiciones. Finalmente, la iluminación dentro de la cámara fue proporcionada por dos tubos fluorescentes (40w) (marca Mitsubishi/Osram FL40SS-W/37), que proveían una intensidad de luz total de $94 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, en cada estante. En cuanto al fotoperiodo, un reloj conmutador (Orbis®) controló el encendido y apagado de las lámparas.

3.1.2. Condiciones de invernadero

Para el crecimiento de las plantas de tomate trasplantadas, los ensayos de persistencia y los ensayos de semicampo se utilizó un invernadero modular ubicado en los campos de prácticas de la E.T.S.I.A.A.B. de Madrid (**Figura 7**).

Figura 7 Invernadero de cristal de la E.T.S.I.A.A.B.

El invernadero constaba de una estructura de cristal, con un sistema de aire acondicionado e iluminación y un programador de riego por goteo. La temperatura y humedad relativa fueron medidas con un registrador electrónico de datos o Datalogger (Tinytag Ultra 2®, Gemini, Chichester, Reino Unido) (**Figura 8**).

Figura 8 Medidor de temperatura y humedad relativa (Tinytag Ultra 2®).

3.2. Material biológico y su manejo

3.2.1. Material vegetal

Para los ensayos de laboratorio extendido y de semicampo se utilizaron plantas de tomate variedad Marmande (Batlle S.A., Molins de Rei, España). El semillado se realizó a 3 cm de profundidad en semilleros de 12 x 6 alvéolos y se empleó como sustrato una mezcla con proporción 1:2 de tierra (Projar, Valencia, España) y vermiculita Termita® (Aminco, Donostia, España).

Las bandejas de siembra se introdujeron en una cámara incubadora SANYO MLR-350, para que las plántulas de tomate tuvieran un crecimiento homogéneo. Dicha cámara posee unas dimensiones internas de 45 cm de ancho, 50 cm de profundo y 130 cm de altura. En la parte frontal superior, presenta un panel de control que permite programar el fotoperiodo y la temperatura. El fotoperiodo se regula por 12 fluorescentes (40w) (marca Mitsubishi/Osram FL40SS-W/37), que proveían una intensidad de luz total de 94 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, distribuidos por los laterales y la puerta de la cámara (4 por cada uno); adicionalmente cuenta con subdivisiones de altura regulable y una puerta de vidrio interna. La humedad relativa se controla mediante la introducción de recipientes con agua y se monitoriza con un termohigrógrafo digital. La temperatura media de germinación fue de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, la humedad relativa (HR) 60 -70 % y el fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (**Figura 9**).

Figura 9 Detalle de la cámara SANYO utilizada para la germinación de las plántulas.

Dos semanas después de la emergencia de las plántulas (7 días después de la siembra, **Figura 10a**), las bandejas de siembra se trasladaban a las condiciones de invernadero (descritas en la sección 3.1.2.); allí se realizó el transplante a macetas de 12 cm de diámetro (**Figura 10b**) y se las dejó crecer hasta alcanzar el tamaño deseado para la realización de los ensayos (50 cm aproximadamente) (según la escala utilizada para la identificación de los estados fenológicos de la planta BBCH es 31).

Figura 10 Material vegetal. a) Semilleros con plántulas de tomate germinadas y b) Plantas de tomate trasplantadas en macetas de 12 cm de diámetro.

3.2.2. Cría de *Nesidiocoris tenuis*

La cría de *N. tenuis* que se describe a continuación fue iniciada en el 2011 por Amor (2013), con 1000 insectos procedentes de la empresa Agrobio (La Mojonera, Almería, España) en su presentación comercial conocida como NESIDIOcontrol®. Los adultos fueron liberados en 2 cajas de metacrilato (40 cm de largo x 30 cm de altura x 30 cm de profundidad), cuya tapa estaba cubierta con visillo en la parte superior para facilitar la ventilación. En ambos laterales y con el fin de facilitar la manipulación de los insectos se disponía de mangas de visillo.

En cada caja de cría de adultos, se introducían 500 insectos del depredador, cuatro comederos (3,5 cm de diámetro) en los que se distribuyeron 3,5 g de huevos de *E. kuehniella* en su presentación comercial conocida como EPHEScontrol® Agrobio y 500 g de judías verdes frescas [*Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)] utilizadas como sustrato de oviposición y bebedero (**Figura 11**).

Figura 11 Detalle caja de metacrilato para la cría de adultos de *Nesidiocoris tenuis*.

Con el fin de tener una producción continua de los enemigos naturales, la puesta de los depredadores se reemplazaba cada dos días y se distribuía en cajas de plástico (22 cm de largo x 10 cm de altura x 7 cm de

profundidad) con una rejilla de ventilación (13 cm largo x 4 cm de ancho) en la tapa (**Figura 12**).

Figura 12 Detalle de las cajas de plástico empleadas para el desarrollo de ninfas de *Nesidiocoris tenuis*.

En cada una de estas cajas se introducían 5 judías verdes con la puesta de 48 horas. A los 7 días, se añadía un comedero (1 cm de diámetro) con 0,4 g de huevos de *E. kuehniella* como alimento de las ninfas neonatas, añadiendo nuevos huevos cada dos días. Las vainas de judías verdes en mal estado se retiraban y se reemplazaban por otras frescas cuando las ninfas alcanzaban el tercer estadio. A los 19 días las ninfas se encontraban en el quinto estadio y se transferían a las jaulas de adultos. En las condiciones utilizadas (sección 3.1.1.), la cría de *N. tenuis* tardaba aproximadamente 23 días en completar el ciclo desde el estado de huevo al estado de adulto.

3.3. Análisis estadísticos

Para el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se utilizaron los programas estadísticos Statgraphics® Plus Versión 5.1 (STSC 1987), IBM SPSS Statistics® Versión 9, paquete fair del Software R (R 2012) y TableCurve 2D 5.01 (SYSTAT 2002).

A continuación se explican de forma detallada (Martínez-González et al. 2001) todos los análisis utilizados en los diferentes ensayos y en la **Figura 13** se resumen todos los procedimientos realizados para cada parámetro

evaluado y en la **Figura 14** se muestra un resumen de los análisis estadísticos utilizados en toda la tesis.

3.3.1. T-Student o Student-Fisher

Este test paramétrico fue utilizado para comparar la media de dos muestras. Las condiciones de aplicación del test t son:

1. **Normalidad o n_1 o $n_2 > 30$:** si el tamaño de la muestra es igual o mayor de 30 se puede presumir que la aproximación de la normal será buena. Si la muestra no es tan grande se deben verificar tres requisitos:
 - i. La distribución de datos puede ser simétrica o asimétrica. Cuando

Figura 13 Análisis estadístico utilizado en cada parámetro evaluado.

la asimetría es positiva la cola de datos a la derecha es más prolongada, si la asimetría es negativa, la prolongación se observará al lado izquierdo. Lo ideal es que la asimetría no sea muy grande; debe ser menor (en valor absoluto) que dos veces su error estándar.

- ii. La curtosis o apuntamiento, representa el grado de aplastamiento de una curva de datos. Este parámetro analiza el grado de concentración de los datos alrededor del valor central o media. Lo ideal es que no sea grande; debe ser menor (en valor absoluto) que dos veces su error estándar.
- iii. El valor máximo y el mínimo de la variable cuantitativa debe estar dentro del intervalo definido por 3 desviaciones estándar por encima y por debajo del valor medio.

2. Homogeneidad de varianzas (homocedasticidad): se debe cumplir que las varianzas de ambos grupos sean iguales u homogéneas ($P \geq 0,05$) mediante la verificación prueba F de Snedecor.

En el caso de que alguna de estas hipótesis de partida no se cumpliera, los datos se transformaron. Se utilizó el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje para corregir los valores expresados en porcentaje [$y = \arcsen \sqrt{(x/100)}$] y para el resto de los casos el logaritmo en base 10 del valor + 1 [$y = \log(x+1)$]. En caso de no lograrlo se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

3.3.2. Análisis de varianzas, ANOVA

Para comparar las medias de más de dos muestras se utiliza el análisis de varianza o ANOVA (*ANalysis Of VAriance*). Este test paramétrico contrasta la hipótesis nula con la hipótesis alternativa, siendo la primera que todas las muestras tienen medias idénticas y la alternativa que hay diferencia entre la media de los grupos.

Al igual que la comparación de dos muestras (*T-student*), es necesario cumplir tres condiciones previas para considerar válidos los resultados del test:

- i. Debe tener mínimo dos tipos de variables: la variable dependiente debe ser cuantitativa, mientras que la o las variables independientes (factores) deben ser categóricas.
- ii. Normalidad: los residuos de los datos de la variable dependiente deben tener una distribución normal o de Gauss. Se comprobó la hipótesis de normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnoff utilizando el *P-value* $\geq 0,05$.
- iii. Homocedasticidad: las dispersiones de los datos no deben diferir entre los grupos a comparar. Este test toma mayor importancia en tamaños de muestra pequeños y con diferentes tamaños de muestra. En el presente estudio se utilizó el test de Barlett ($P \geq 0,05$) para su verificación.

En el caso de que alguna de las estas hipótesis de partida no se cumpliera, los datos se transformaron utilizando las expresiones descritas anteriormente. En cualquier caso, el análisis de la varianza se considera una técnica “robusta” porque sus resultados se alteran muy poco si se producen ciertas transgresiones de las condiciones de normalidad y homocedasticidad. Cuanto mayor sea el tamaño de la muestra menos importante es que haya una desviación de estas premisas, especialmente si todos los grupos a comparar son del mismo tamaño muestral. Cuando no se cumplen estas premisas se recurrió al test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Según el objetivo del ensayo fueron utilizados diferentes tipos de ANOVA:

- i. *Anova de una vía*: en este caso relacionamos una de las variables, la variable de agrupación o cualitativa (categórica) y la variable de resultado o cuantitativa (dependiente).
- ii. *Anova de dos vías*: es un diseño factorial simple, que está dentro de los modelos lineales generales. En este caso se utilizaron tres variables, dos variables categóricas o factores y una variable cuantitativa o de respuesta (numérica). El efecto de los factores son los efectos principales y el efecto de sus combinaciones se conoce como interacción de los mismos. La interacción representa una sinergia o potenciación entre los factores y no un efecto de acumulación entre ellos.
- iii. *Anova de medidas repetidas*: en este caso disminuimos la variabilidad aleatoria al comparar las diferencias dentro de cada unidad experimental (diseño pareado). Como hipótesis nula se utilizó la igualdad de los grupos de medias en ambos momentos de la medición.

3.3.3. Análisis de covarianzas, ANCOVA

El análisis de la covarianza (ANCOVA, *ANalysis of COVariance*) se eligió con el fin de eliminar la heterogeneidad de la variable dependiente por la influencia de variables cuantitativas o covariables.

3.3.4. Test de las mínimas diferencias significativas, LSD

Una vez comprobada la validez del ANOVA y después de obtener un valor con diferencias significativas ($P < 0,05$) se utilizó el test de las mínimas diferencias significativas o LSD (*Least Significant Difference*). Este

test separa las medias de los datos en grupos homogéneos y determina el valor mínimo necesario para estimar las diferencias entre tratamientos.

3.3.5. Test de Dunn

Esta prueba es utilizada para estimar las diferencias ($P < 0,05$) entre medias tras haber utilizado el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Consiste en agrupar las medias muestrales según los rangos mínimos significativos. Tiene mayor fuerza para encontrar diferencias que otras pruebas no paramétricas por tener un umbral (punto en el cual se establece si hay o no diferencias entre todas las comparaciones múltiples) que depende del número de medias a comparar o umbral móvil.

3.3.6. Distribución de Weibull

Se empleó la función Weibull para ajustar las curvas de probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo (Pinder III et al. 1978).

Esta distribución muestra una probabilidad continua y está dada por la siguiente ecuación:

$$S_t = e^{-(t/b)^\beta}$$

donde, S_t es la probabilidad de sobrevivir a una edad determinada, t es el tiempo expresado en días, b es el parámetro que describe la escala y β es el parámetro que describe la forma de la curva. Para establecer diferencias entre las curvas de supervivencia ($P < 0,05$), se emplearon los tests de Wilcoxon (detecta diferencias en la parte inicial de la curva) y de Log-Rank (detecta diferencias al final de la curva).

Figura 14 Resumen análisis estadísticos.

3.4. Clasificación toxicológica de los insecticidas

Para la clasificación final de los productos se utilizaron dos criterios: **1)** Cada parámetro se evaluó de forma independiente y como clasificación final se utilizó la categoría más desfavorable entre los parámetros estudiados. **2)** Se tuvieron en cuenta el efecto letal y los efectos subletales, utilizando la fórmula de efecto total.

3.4.1. Categoría más desfavorable

Para el efecto letal, se corrigió el incremento en el porcentaje de mortalidad a las 72 h de cada tratamiento respecto al control, utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener 1981), siendo M el porcentaje de mortalidad:

$$M_{\text{corregida}} = \frac{M_{\text{tratado}} - M_{\text{control}}}{100 - M_{\text{control}}} \times 100$$

Para la corrección de los valores obtenidos en cada uno de los efectos subletales, se utilizó la fórmula de Abbott:

$$P_{\text{corregido}} = 1 - \frac{P_{\text{tratado}}}{P_{\text{control}}} \times 100$$

3.4.2. Efecto total

Se utilizó una modificación de la fórmula propuesta por Overmeer y van Zon (1982):

$$E = 100 - |(100 - M_c) \times R_1 \times R_2 \dots R_x|$$

donde, E es efecto total del producto; M_c corresponde a la mortalidad corregida (efecto letal) y R_x corresponde a la proporción de cada uno de los

parámetros evaluados por el tratamiento teniendo en cuenta el control de los mismos.

Para no magnificar el efecto causado por los insecticidas al estimar la clasificación total de los productos, se utilizó el criterio empleado por Planes et al. (2013), de forma que cuando los parámetros eran estadísticamente iguales al control ($P \geq 0,05$), se asignaba el valor 0 en el efecto letal o 1 en los efectos subletales.

En todos los casos los insecticidas fueron clasificados teniendo en cuenta las cuatro categorías toxicológicas propuestas por la OILB (Sterk et al. 1999, Hassan 1994). Para los ensayos de laboratorio en los que se aplicó el insecticida sobre superficie inerte las categorías OILB usadas fueron: 1: inocuo ($E < 30\%$), 2: ligeramente tóxico ($30 - E - 79\%$), 3: moderadamente tóxico ($80 - E - 99$) y 4: tóxico ($E > 99$). Para el resto de los ensayos las categorías OILB fueron: 1: inocuo ($E < 25\%$), 2: ligeramente tóxico ($25 - E - 50\%$), 3: moderadamente tóxico ($51 - E - 75\%$) y 4: tóxico ($E > 75\%$).

Las categorías de persistencia, teniendo en cuenta la pérdida de toxicidad del producto (categoría OILB 1) fueron (Hassan 1994): A, producto de vida corta (< 5 días); B, ligeramente persistente (entre 5 y 15 días); C, moderadamente persistente (entre 16 y 30 días) y D, persistente (más de 30 días).

Capítulo IV. Toxicidad de modernos insecticidas por contacto residual sobre *Nesidiocoris tenuis* en condiciones de laboratorio

4.1. Introducción

Para determinar el impacto de los plaguicidas en los enemigos naturales, la OILB recomienda evaluar preferentemente, entre todas las formas de contaminación posible, la exposición a residuos frescos, ya que es la forma por la que parasitoides y depredadores se contaminan de forma más frecuente en el cultivo (Croft 1990).

La primera fase del estudio se realiza en condiciones controladas de laboratorio. De esta forma, se consigue una mayor simplicidad en la ejecución de los ensayos y, lo que es más importante, se maximiza la exposición del organismo estudiado a los residuos. Con el fin de homogeneizar los estudios y obtener resultados comparables que puedan intercambiarse, se han establecido una serie de directrices a seguir para la realización de los ensayos en condiciones de laboratorio (Hassan 1987, 1994, Sterk et al. 1999).

Las directrices para los estados de desarrollo más expuestos o susceptibles son:

- Exposición de los organismos a residuos frescos aplicados sobre placas de cristal, hojas, arena o tierra.
- En el caso de hongos benéficos, nematodos y colémbolos la exposición se hará en el medio estándar contaminado (basado en agar, suelo o ambos).

- La cantidad de plaguicida aplicado debe formar un depósito de 1 a 2 mg de la solución/cm² sobre sustratos de cristal u hoja y de 2 a 6 mg/cm² sobre arena.
- Utilizar la mayor concentración del plaguicida recomendada en campo.
- Los insectos utilizados (cría de laboratorio o recogidos en campo) deben ser de edad uniforme.
- Garantizar un periodo de exposición antes de comenzar la evaluación de efectos.
- Asegurar una ventilación adecuada de las unidades experimentales.
- Siempre usar un tratamiento control de agua. Se recomienda además incluir controles estándar positivos (plaguicidas).
- Evaluación de la mortalidad y reducción en la capacidad benéfica (parasitismo, oviposición en el caso de los depredadores).
- Uso de las categorías según el porcentaje de mortalidad o reducción en la capacidad benéfica: 1 = inocuo (<30%), 2 = ligeramente tóxico (30-79%), 3 = moderadamente tóxico (80-99%) y 4 = tóxico (> 99%).

Para los estados de desarrollo más protegidos o resistentes: se recomienda la pulverización directa de los organismos y del sustrato que los contiene.

En la fase de laboratorio se dan las condiciones más desfavorables, ya que el enemigo natural tiene mayor riesgo de contaminación por estar confinado en un espacio tratado más reducido comparado con las condiciones más realistas de semicampo o campo; de esta forma, se asume que los productos que resultan inocuos en esta etapa pueden ser recomendados directamente a los agricultores sin necesidad de más

estudios. La identificación temprana y relativamente sencilla de los productos fitosanitarios no tóxicos o de baja toxicidad en agentes de control biológico permite trasladar con rapidez una información fundamental para los programas de manejo integrado de plagas. Estudios realizados por Thomson y Hoffmann (2006) han comprobado la predicción de inocuidad obtenida en condiciones de laboratorio, tras su estudio en condiciones de campo (viñedos) de diferentes agentes beneficios, en particular de arañas, crisopas, carábidos y parasitoides.

Sin embargo, en el caso de que los productos inocuos (categoría OILB 1) se apliquen repetidamente en campo se recomienda seguir con el protocolo de estudios de toxicidad (Hassan 1994, van de Veire et al. 2002). Por otro lado, la evaluación en laboratorio podría subestimar la toxicidad del plaguicida, como comprobaron Bakker y Jacas (1995) en ácaros depredadores de la familia Phytosaiidae. Estos autores indican que las razones de estos errores podrían deberse a que en laboratorio no se evalúen determinados efectos subletales, o porque en estas condiciones no se refleje el impacto real en la dinámica poblacional del auxiliar o también indirectamente, en especial en enemigos especialistas, porque el plaguicida reduce la disponibilidad de alimento.

Además, dentro de la misma especie puede haber importantes diferencias de susceptibilidad a los tóxicos entre los estados de desarrollo (Ruberson et al. 1998), por lo que es necesario estudiar el estado menos susceptible (protegido) y el más susceptible (expuesto). En general, se acepta que los adultos de los parasitoides y las etapas juveniles (larvas y ninfas) de artrópodos depredadores son los estados más susceptibles; mientras que los estados protegidos son la etapa juvenil de los endoparasitoides y los adultos de artrópodos depredadores, habiendo numerosas excepciones a

esta regla (Sterk et al. 1999) y muchas veces los estados de huevo y pupa son los más tolerantes (Medina et al. 2003).

El ensayo de laboratorio extendido es una evaluación adicional que puede realizarse antes de pasar a la fase de semicampo. Las principales diferencias son que el producto se aplica sobre un sustrato natural (normalmente vegetal), y las condiciones de temperatura, humedad y luz deben ser fluctuantes, imitando las condiciones reales de campo en verano (Hassan 1994); en este caso los intervalos para la clasificación toxicológica de los productos son los mismos que los de semicampo y campo (van de Veire et al. 2002).

Finalmente, si los residuos frescos resultan perjudiciales para el enemigo natural es importante identificar la persistencia de este efecto negativo. Para ello, se realizan evaluaciones de exposición a residuos aplicados sobre el sustrato natural en distintos periodos o intervalos de tiempo después de la aplicación, hasta la pérdida de toxicidad o hasta que transcurre un mes después del tratamiento (Hassan 1992, 1994). Los residuos sobre material vegetal deben estar expuestos a las condiciones reales de un día de verano o simulando tales condiciones (Sterk et al. 1999).

4.2. Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron los siguientes:

- Evaluar la toxicidad del residuo fresco de los insecticidas en un ensayo de laboratorio en ninfas de tercer estadio y adultos de *N. tenuis*, con el fin de establecer el estado de desarrollo más susceptible y el más tolerante.
- Establecer la persistencia de los insecticidas utilizando el estado de desarrollo del depredador más susceptible.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. *Nesidiocoris tenuis*

Los individuos utilizados en estos ensayos provenían de la cría mantenida en condiciones de laboratorio (sección 3.1.1.). Se utilizaron adultos del depredador de edad uniforme (< 72 h después de la emergencia). En el caso del estado juvenil, se eligió el tercer estadio (< 24 h después de la muda) por ser la etapa intermedia de desarrollo, momento en el que la dieta carnívora comienza a ser relevante a diferencia de los estadios anteriores (De Puyseleyn et al. 2012). Para asegurar la disponibilidad de un número elevado de ninfas en el mismo estadio, fue necesario incrementar la puesta obtenida en 24 horas, duplicando el número de judías verdes ofrecidas a los adultos en las cajas de cría mencionadas en el capítulo III (sección 3.2.2. **Figura 11**). Catorce días después, la mayoría de la población de los huevos provenientes de esta puesta estaba en el estadio deseado para el ensayo. Las ninfas N₃ se reconocen fácilmente porque los esbozos alares empiezan a ser visibles (El Dessouki et al. 1976).

4.3.2. Exposición de ninfas y adultos a residuos frescos sobre sustrato inerte

4.3.2.1. Aplicación de los productos

Para la aplicación de los productos se utilizó la Torre de Potter® (**Figura 15**) (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, Hertfordshire, UK), un pulverizador automático que permite la distribución homogénea del insecticida, utilizando el tamaño de gota más pequeño posible sobre la superficie a tratar (Potter 1952).

Figura 15 Torre de Potter®.

Antes de comenzar la aplicación de los tratamientos fue necesario calibrar la Torre de Potter para garantizar que el valor del residuo se encuentra entre 1,5 y 2,0 mg/cm² según recomendaciones de la OILB (Hassan 1994). Para esto se taró un portaobjetos de área conocida, posteriormente se pulverizó 1 ml de agua destilada sobre él y se registró el peso final en una balanza de precisión. El procedimiento fue realizado 10 veces obteniendo un depósito sobre las placas de vidrio de 1,8 mg/cm² ± 0,02 en el ensayo de

ninfas y $1,6 \text{ mg/cm}^2 \pm 0,03$ en el ensayo de adultos. En los ensayos el equipo fue calibrado a una presión de 55 KPa y el volumen de la solución del insecticida aplicado en cada pulverización fue de 1 ml.

Para evitar la presencia de posibles restos de residuos de insecticidas, se limpió la Torre de Potter al inicio del ensayo, entre tratamientos y al final de la aplicación de los insecticidas. En todos los casos se realizó un primer lavado con agua destilada y un segundo lavado con acetona. Para ambos estados de desarrollo las pulverizaciones se iniciaron con agua destilada, en el caso de la exposición de adultos esta primera aplicación fue seguida por flonicamida, spirotetramat, sulfoxaflor, metaflumizona, flubendiamida y finalizaron con el control positivo, deltametrina. En el caso del ensayo con ninfas y teniendo en cuenta los resultados de toxicidad en adultos, las últimos tres productos fueron deltametrina, metaflumizona y sulfoxaflor respectivamente.

4.3.2.2. Efecto letal

Las unidades experimentales consistieron en cajas desmontables que son una adaptación de las diseñadas por Jacas y Viñuela (1994). Están formadas por dos placas de vidrio cuadradas (12 cm^2 de área x 0,5 cm de grosor) tratadas en una sola cara. Una vez secas, las dos placas se unieron mediante un aro de metacrilato libre de insecticida (10 cm de diámetro x 3 cm de altura) de forma que los residuos quedaron en las superficies internas de la caja tratada.

El aro poseía 6 orificios, dos de los cuales (0,5 cm de diámetro) fueron cubiertos con visillo y utilizados para ventilación, mientras que tres orificios (0,7 cm de diámetro) fueron cubiertos con cinta de pintor para

evitar la huida de los insectos. En el diseño original estos orificios tenían la función de suministrar alimento y líquido a los insectos, al igual que la introducción de los mismos a la unidad experimental. El último orificio de 0,7 cm de diámetro, se utilizó para colocar una aguja hipodérmica conectada a un circuito de ventilación forzada. Dicho circuito consta de una bomba de acuario conectada a un Erlenmeyer de 1 L de capacidad (cuyo interior contenía 900 ml de agua), que distribuye el aire de forma continua a las unidades experimentales por medio de un tubo de goma (**Figura 16**). Además, en el caso del ensayo realizado con ninfas fue necesario colocar un aro de plastilina para sellar la unión del aro de metacrilato con la placa de vidrio inferior y evitar que las ninfas escaparan (**Figura 17a**).

En el interior de cada caja desmontable se colocó un comedero con huevos de *E. kuehniella* (*ad libitum*) como fuente de proteína y un trozo de judía verde (aproximadamente 3 cm) como fuente de líquido; la judía fue sellada en los extremos con parafina (Panreac química SAU, España) para evitar la formación de hongos y la entrada de los individuos en el interior de la vaina, lo que disminuiría la exposición al residuo de los insecticidas.

Figura 16 Montaje final del ensayo de exposición residual de laboratorio. a) Erlenmeyer de 1 L de capacidad. b) Tubo de goma cuyo interior distribuye el aire. c) Unidad experimental unida al tubo de goma por medio de una aguja hipodérmica.

Finalmente, cada caja desmontable se mantuvo unida durante el tiempo de exposición por medio de dos gomas elásticas (**Figura 17b**) y en cada una se liberaron 15 individuos (ninfas en estadio N₃ o adultos con < 72 h de edad) del depredador. A las 24 y 72 h de exposición, los individuos que no reaccionaron después de ser tocados varias veces por un pincel fino fueron considerados muertos. En total se utilizaron cinco repeticiones por estado de desarrollo e insecticida, para un total de 75 individuos por tratamiento. El efecto letal fue calculado tras contar el número de individuos muertos a las 72 h de exposición.

Figura 17 Unidad experimental para el ensayo con residuo fresco sobre sustrato inerte a) Placa de cristal tratada y ubicada como base de la unidad experimental, con detalle en el aro de plastilina utilizado en el ensayo con ninfas N₃ de *Nesidiocoris tenuis*. b) Montaje final de la unidad experimental para ambos estados de desarrollo.

4.3.2.3. Efecto en la reproducción

Una vez transcurrido el periodo de exposición a los residuos frescos de los insecticidas (72 h), los individuos supervivientes se transfirieron a cajas de plástico sin residuos (12 cm de diámetro x 5 cm de altura) con ventilación en la parte superior cubierta con visillo (5,5 cm de diámetro) (**Figura 18**). En el ensayo con ninfas de tercer estadio, se realizó un seguimiento de su

desarrollo hasta alcanzar la etapa adulta, con el objetivo de evaluar si los insecticidas producían mortalidad diferida en las ninfas (número de ninfas que llegan a adulto) y/o un retraso en su desarrollo. Durante este periodo las ninfas se alimentaron *ad libitum* con huevos de *E. kuehniella* y se utilizó un trozo de judía verde fresca como bebedero.

Figura 18 Unidad experimental para evaluar la supervivencia de ninfas expuestas a una superficie inerte tratada cajas de plástico sin residuos de insecticidas y con ventilación.

Una vez finalizada la exposición de los residuos (72 h) y para estimar el efecto de los insecticidas en la reproducción (número de ninfas emergidas por hembra y día), los adultos supervivientes de cada tratamiento se sexaron con ayuda de una lupa binocular (Leica® MZ6) y se formaron doce parejas (repeticiones), las cuales se colocaron en cajas de plástico (9 cm de diámetro x 3 cm de altura) con ventilación en la tapa (5,5 cm de diámetro); como fuente de proteína se utilizó un comedero (1 cm de diámetro) con 0,5 g de huevos de *E. kuehniella* y como sustrato de oviposición además de fuente de líquido, una vaina completa de judía verde (**Figura 19a**). Durante un periodo de seis días, se realizaron 3 cambios del sustrato de oviposición (cada 2 días) y las vainas retiradas se individualizaron en

vasos de plástico (8 cm de diámetro, 11 cm de altura) cubiertos con visillo en la parte superior (**Figura 19b**). Transcurridos once días de retirada la judía y sobre una superficie de color blanco, se realizó el conteo del número de ninfas obtenidas en cada tratamiento.

Figura 19 Unidades experimentales para la evaluación de la reproducción. a) Cajas de plástico con el sustrato de oviposición, el comedero de huevos de *Ephestia kuehniella* y la pareja de *Nesidiocoris tenuis*. b) Vaso de plástico que contiene la vaina de judía con la puesta de *Nesidiocoris tenuis* para evaluar el número de ninfas por hembra y día.

4.3.3. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal. Evaluación de la persistencia

4.3.3.1. Aplicación de los productos

En el exterior del invernadero en el que habían crecido las plantas de tomate (50 cm de altura, BBCH: 31) (**Figura 20a**) y utilizando un pulverizador manual por insecticida (**Figura 20b**), se trataron hasta el punto de goteo (25 ml por planta) cuatro plantas por tratamiento (**Figura 20c**). Una vez seco el residuo (2 - 3 h), las plantas se llevaron al laboratorio en el caso del residuo fresco o se introdujeron de nuevo en el interior del invernadero para dejar envejecer los residuos y poder realizar la evaluación de la persistencia de los productos a evaluar. Al no disponer

del tiempo necesario para la realización de los ensayos de persistencia con una sola aplicación del producto y con el objetivo de tener los residuos deseados [4, 10, 23 y 34 días después del tratamiento (DDT)], se trataron las plantas de tomate los días 2 y 24 de abril y los días 7 y 30 de Mayo de 2012. Las condiciones ambientales en las que se degradaron los residuos dentro del invernadero se presentan en la **Tabla 3**.

Figura 20 Plantas de tomate utilizadas en los ensayos sobre sustrato vegetal. a) Distribución de plantas al aire libre dispuestas para aplicación de los insecticidas. b) Pulverizador manual utilizado para la aplicación de los productos. c) Detalle después de la aplicación, hasta punto de goteo.

Tabla 3 Condiciones ambientales de los residuos del ensayo de persistencia realizados en el año 2012.

Parámetro	RESIDUO: 4 DDT 10 DDT 23 DDT 34 DDT				
	Fecha aplicación productos:	2 de Abril	7 de Mayo	24 de Abril	30 de Mayo
	Fecha inicio ensayo:	6 de Abril	17 de Mayo	17 de Mayo	3 de Julio
Temperatura °C	Mínima	19,3 ± 0,4	22,3 ± 0,2	21,0 ± 0,6	22,8 ± 0,1
	Media	19,9 ± 0,4	22,8 ± 0,2	21,6 ± 0,1	23,7 ± 0,1
	Máxima	20,6 ± 0,5	23,3 ± 0,2	22,2 ± 0,5	26,4 ± 0,1
Humedad relativa	Mínima	57,3 ± 0,9	62,7 ± 0,3	58,5 ± 0,1	61,1 ± 0,1
	Media	59,9 ± 0,9	65,1 ± 0,3	61,3 ± 0,1	64,3 ± 0,1
	Máxima	62,8 ± 0,6	67,4 ± 0,2	63,8 ± 0,1	67,5 ± 0,1
Radiación (MJ/m ²) ^a	Media	11,3 ± 0,6	25,0 ± 0,2	21,1 ± 0,1	26,9 ± 0,1

Los datos son la media de los valores registrados durante todo el periodo de degradación de los residuos, procedentes de un data logger ubicado en el mismo módulo del invernadero donde permanecieron las plantas tratadas. DDT: días después del tratamiento. ^aValores obtenidos por el sistema de información Agroclimática SIAR (SIAR 2016).

4.3.3.2. Evaluación del efecto letal

Con el objetivo de conocer la mortalidad producida por el residuo de los compuestos aplicados sobre el tejido vegetal y teniendo en cuenta el estado de desarrollo más susceptible (sección anterior); se expusieron 15 adultos (< 72 h de edad) de *N. tenuis* a una hoja de la planta tratada con residuos de 0 (fresco), 4, 10, 23, o 34 días después del tratamiento (DDT). Con el fin de asegurar la hidratación del tejido vegetal, se cortaron los últimos tres folíolos de la hoja con residuo y se introdujo el pedúnculo en un eppendorf de 1,5 ml de capacidad, lleno previamente con agar nutritivo (Manuel Riesgo® S. A.) al 3% (100 ml de agua destilada a punto de ebullición y 3 g de agar).

El ápice de las plantas con los residuos de 10, 23 y 34 DDT, se marcó en el momento del tratamiento, con cintas de colores con el fin de diferenciar las hojas nuevas sin residuo, de las hojas tratadas y utilizadas en los ensayos de persistencia. Los adultos y la hoja tratada se colocaron, junto con 0,4 g de huevos de *E. kuehniella*, en una caja de plástico redonda (12 cm diámetro, 5 cm de altura, ventilación en la tapa de 5,5 cm de diámetro) (**Figura 21**). Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. La exposición a los residuos se mantuvo durante 72 h, registrándose el número de individuos muertos a las 24 y 72 h después de iniciado el ensayo.

Figura 21 Unidad experimental empleada en ensayo de persistencia.

4.3.3.3. Evaluación en la reproducción

Para la evaluación de la reproducción se utilizó la misma metodología empleada en el ensayo de laboratorio sobre sustrato inerte (Sección 4.3.2.3).

4.4. Resultados

4.4.1. Exposición de ninfas y adultos a residuos frescos sobre sustrato inerte

4.4.1.1. Efecto letal

Los insecticidas deltametrina y sulfoxaflor causaron una mortalidad significativamente mayor a la obtenida en el control sobre las ninfas de *N. tenuis* (**Figura 22a**). Tras 24 h de exposición, la mortalidad del testigo fue de $1,3\% \pm 1,3$; deltametrina incrementó la mortalidad hasta el $11,8\% \pm 3,2$ y sulfoxaflor hasta el $21,3\% \pm 6,5$ ($F = 7,39$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$). La mortalidad acumulada después de tres días de exposición se incrementó considerablemente para sulfoxaflor, alcanzando el $89\% \pm 6,1$, mientras que deltametrina solo produjo un $22,2\% \pm 3,1$ de mortalidad. En el tratamiento con agua la mortalidad fue de $2,9\% \pm 2,9$, el resto de los tratamientos evaluados no tuvieron efecto letal en las ninfas ($F = 91,64$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$).

En el estado de desarrollo adulto (**Figura 22b**), el impacto de los plaguicidas fue mayor que en las ninfas. Las mortalidades significativamente diferentes respecto al control negativo ($8,0\% \pm 2,5$) a las 72 h de exposición se observaron en los tratamientos de deltametrina ($45,3\% \pm 7,1$), metaflumizona ($66,7\% \pm 12,3$) y sulfoxaflor (100%) ($F = 19,52$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$). Sin embargo, en las primeras 24 h solo sulfoxaflor produjo una mortalidad significativamente mayor respecto del control ($14,7\% \pm 6,8$) con un efecto de choque muy claro, ya que mató al $74,4\% \pm 9,7$ de los individuos expuestos ($F = 12,15$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$).

Figura 22 Porcentaje de mortalidad de ninfas N₃ (a) y adultos (b) de *Nesidiocoris tenuis*, tras la exposición a residuos frescos sobre sustrato inerte, en condiciones de laboratorio. Los valores son la media $\pm$ ES de cinco repeticiones (N = 15) de la mortalidad a las 24 h (efecto de choque) y a las 72 h (mortalidad acumulada). Las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 24 h (mayúsculas) o 72 h (minúsculas) de exposición, con un nivel de significación de $P < 0,05$.

Al analizar de forma conjunta los resultados de mortalidad de los dos ensayos mediante el test ANOVA de medidas repetidas (rANOVA), con el tiempo de exposición (T) (24 h y 72 h) como factor de medida repetida y estado de desarrollo (E) e insecticida (I) como factores fijos o variables independientes, se encontró que el efecto letal depende significativamente de todos los factores considerados (**Tabla 4**) **1.** Del tiempo, ya que la mortalidad se acentúa en periodos de exposición más largos (mortalidad a las 72 h), comparado con el tiempo inicial de evaluación (mortalidad a las 24 h). **2.** Del estado de desarrollo, siendo más susceptible la etapa adulta que la etapa de ninfa N_3 y **3.** Del tipo de insecticida ya que no todos los productos generaron el mismo efecto letal.

Por otra parte, la interacción entre el factor estado de desarrollo y el factor tipo de insecticida ($E \times I$) resultó no significativa, lo que muestra que ambos factores se comportaron de forma independiente y por tanto la magnitud de las diferencias de mortalidad observadas entre los estados de desarrollo fue igual para todos los insecticidas. La interacción entre el tiempo de exposición y el estado de desarrollo ($T \times E$) resultó significativa debido a que la diferencia de mortalidad observada entre ninfas y adultos de acentuó a periodos de exposición más largos.

También resultó significativa la interacción entre el tiempo de exposición y el tipo de insecticida ($T \times I$). Se observa que el efecto de los insecticidas es en general mayor a las 72 h, pero la magnitud de la diferencia respecto a las 24 h es distinta dependiendo del insecticida. Para algunos se acentúa mucho (sulfoxaflor en ninfas, metaflumizona en adultos), para otros solo un poco (deltametrina, spirotetramat), y para otros casi nada (flubendiamida, flonicamida). Finalmente, también se observó un efecto significativo en la interacción de los tres factores ($T \times E \times I$), lo que

indica que los efectos de los insecticidas sobre los distintos estados de desarrollo son diferentes a medida que se aumenta el periodo de exposición.

Tabla 4 Resultados del test rANOVA para el análisis de mortalidad en ninfas N₃ y adultos de *Nesidiocoris tenuis* tras estar expuestos a residuo fresco de insecticidas sobre sustrato inerte.

Factor	df	F	P
Tiempo (T)	1, 56	168,137	< 0,0001
Estado de desarrollo (E)	1, 56	46,017	< 0,0001
Insecticida (I)	6, 56	36,401	< 0,0001
Estado x Insecticida (E x I)	6, 56	1,848	0,106
Tiempo x Estado (T x E)	1, 56	5,539	0,022
Tiempo x Insecticida (T x I)	6, 56	16,706	< 0,0001
Tiempo x Estado x Insecticida (T x E x I)	6, 56	8,869	< 0,0001

4.4.1.2. Efectos subletales

4.4.1.2.1. Efecto en el desarrollo ninfal

El tiempo de desarrollo de las ninfas fue similar para todos los tratamientos excepto en el caso de sulfoxaflor a los 6 días de evaluación ($F = 13,46$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$). En este momento, las ninfas supervivientes a la exposición de este insecticida estaban en N₄ mientras en el resto de los tratamientos y en el control predominaban las ninfas en el último estadio (N₅) y aparecían los primeros adultos (**Figura 23**).

Figura 23 Porcentajes de individuos en cada estado de desarrollo (N₃, N₄, N₅ o adultos) a lo largo del tiempo, después de estar expuestas ninfas N₃ a residuos frescos de seis insecticidas durante 72 h sobre sustrato inerte (condiciones de laboratorio). Cada tratamiento es la media de cinco repeticiones (N = 15).

Para el resto de los tratamientos, la mayoría de las ninfas supervivientes alcanzaron el estado adulto entre los 8 y 10 días sin diferencias estadísticas (**8**: $F = 0,21$; $df = 5, 29$; $P = 0,9539$ y **10**: $F = 0,98$; $df = 5, 29$; $P = 0,4528$). Estos valores coinciden con la duración del ciclo en individuos no expuestos a plaguicidas al ser alimentados con huevos de *E. kuehniella* y judía verde fresca, e incluso alimentados con la misma fuente de proteína y con una solución de sacarosa al 0,5M (**Tabla 5**); son resultados no analizados en este documento, pero obtenidos en estudios de seguimiento y optimización de la cría del depredador realizados en paralelo al trabajo de tesis.

Tabla 5 Duración en días (media $\pm$ ES) del desarrollo de los estadios N₃ a N₅ de *Nesidiocoris tenuis* en condiciones de laboratorio.

Alimento	N ₃	N ₄	N ₅	N ₃ - N ₅
Judía verde fresca	2,0 $\pm$ 0,1 a	3,0 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,3
Sacarosa 0,5M	2,5 $\pm$ 0,2 a	3,8 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,4

Los datos son la media de 26, 21, 20 y 20 réplicas en la dieta de judía verde y 21, 19, 11 y 11 en la solución de sacarosa. El número de réplicas no es constante debido a la muerte de las ninfas a lo largo del ensayo.

Teniendo en cuenta la supervivencia de las ninfas expuestas al tratamiento del agua (90,1% $\pm$ 3.9), se observó una reducción significativa en el tratamiento de deltametrina respecto el testigo y del 100% en el de sulfoxaflor ($F = 93,10$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$) (**Tabla 6**).

Tabla 6 Efectos en la supervivencia de ninfas y reproducción de los adultos provenientes de ninfas N₃ y adultos de *Nesidiocoris tenuis* expuestos durante 72 h a residuo fresco sobre sustrato inerte en condiciones de laboratorio

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Ninfas		Adultos
		Supervivencia ¹	Reproducción ²	Reproducción ²
Testigo	-	90,1 ± 3,9 a	4,1 ± 0,7 a	5,6 ± 0,5 a
Deltametrina	12,5	67,2 ± 3,7 b	3,1 ± 0,6 a	1,7 ± 0,5 c
Flonicamida	60	90,7 ± 3,4 a	3,8 ± 0,4 a	3,4 ± 0,5 b
Flubendiamida	60	89,1 ± 3,5 a	3,5 ± 0,9 a	2,3 ± 0,5 bc
Metaflumizona	240	86,3 ± 5,1 a	3,3 ± 0,5 a	-
Spirotetramat	75	89,4 ± 3,3 a	3,4 ± 0,5 a	2,5 ± 0,6 bc
Sulfoxaflor	60	0,0 ± 0,0 c	-	-

En cada columna, los datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (ANOVA, LSD; $P \geq 0,05$).

¹Porcentaje de ninfas que alcanzan la etapa adulta. Los valores representan la media ± ES de cinco repeticiones (N = 15).

²Número de ninfas descendientes de *N. tenuis* por hembra y día. Los valores son la media ± ES de doce repeticiones (N = 1 macho y 1 hembra).

4.4.1.2.2. Efecto en la reproducción

En el ensayo de ninfas expuestas al residuo fresco ningún tratamiento afectó al parámetro de la reproducción de los supervivientes que llegaron a la etapa adulta ($F = 0,35$; $df = 5, 71$; $P = 0,8994$) (**Tabla 6**). El caso opuesto se observó en el ensayo de adultos, ya que todos los tratamientos mostraron una reducción significativa respecto al control en el número de ninfas producidas por hembra y día ($F = 8,05$; $df = 4, 59$; $P < 0,0001$). La reducción más severa se registró en el tratamiento con deltametrina. Este parámetro no se evaluó en las ninfas expuestas a sulfoxaflor, ni en los adultos expuestos a metaflumizona y sulfoxaflor ya que no hubo suficientes supervivientes.

Al analizar estos resultados con un test ANOVA de dos vías, se detecta que el factor estado de desarrollo (E) afecta al número de ninfas obtenidos por día y hembra en los adultos provenientes de ninfas y adultos de *N. tenuis* expuestos al residuo fresco de insecticidas sobre sustrato inerte. Sin embargo, la interacción entre factores ($I \times E$) no fue estadísticamente significativa (**Tabla 7**).

Tabla 7 Tabla de ANOVA de dos vías para la reproducción producida por *Nesidiocoris tenuis*, tras estar expuesto a residuo fresco de insecticidas sobre sustrato inerte en el estado de ninfa N_3 o en adulto.

Factor	df	F	P
Estado de desarrollo (E)	1, 169	10,637	0,001
Insecticida (I)	4, 169	5,716	< 0,001
Estado x Insecticida ($I \times E$)	4, 169	0,590	0,670

4.4.1.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas (residuo fresco sobre sustrato inerte)

La clasificación de toxicidad final de los insecticidas evaluados teniendo en cuenta los criterios de la máxima categoría toxicológica individual o del valor del efecto total demuestra una mayor susceptibilidad de los adultos a los insecticidas, en comparación con las ninfas de tercer estadio (**Tabla 8**). Por esta razón, los ensayos de persistencia y de semicampo se realizaron con adultos del depredador.

Sulfoxaflor fue un producto tóxico (categoría OILB 4) para las ninfas y los adultos expuestos al residuo fresco sobre sustrato inerte, en ambos casos tuvo un importante efecto letal en los (mortalidad corregida del 87,6% en la exposición de ninfas y del 100% en la de adultos) y no fue posible evaluar su impacto en la reproducción. Los residuos de flonicamida, flubendiamida, metaflumizona y spirotetramat fueron inocuos (categoría OILB 1) en ninfas y ligeramente tóxicos (categoría OILB 2) en adultos.

Cabe destacar los casos particulares de deltametrina y metaflumizona. Según la máxima categoría de los parámetros evaluados, el residuo de deltametrina se clasificó como inocuo (categoría OILB 1) para las ninfas y ligeramente tóxico (categoría OILB 2) en adultos; sin embargo, según la clasificación de efecto total en ambos casos la clasificación aumento una categoría, siendo categoría OILB 2 en ninfas y categoría OILB 3 en adultos. Aunque la clasificación del residuo de metaflumizona fue la misma (categoría OILB 2) utilizando ambos criterios, debido a su alto efecto en la mortalidad, solo se tuvo en cuenta el efecto letal y por tanto la clasificación final no es comparable con los otros productos.

Tabla 8 Clasificación toxicológica según la OILB de los insecticidas evaluados en ninfas N₃ y adultos de *Nesidiocoris tenuis* por contacto residual en condiciones de laboratorio (sustrato inerte).

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Ninfas						Adultos				
		Mc	S _c	R _c	CM	ET	CT	Mc	R ₂	CM	ET	CT
Deltametrina	12,5	20,2 (1)	25,4 (1)	1	1	40,5	2	35,9 (2)	69,3 (2)	2	80,3	3
Flonicamida	60	0 (1)	1	1	1	0	1	0 (1)	38,9 (2)	2	38,9	2
Flubendiamida	60	0 (1)	1	1	1	0	1	0 (1)	59,1 (2)	2	59,1	2
Metaflumizona	240	0 (1)	1	1	1	0	1	70,0 (2)	-	2*	70,0	2*
Spirotetramat	75	0 (1)	1	1	1	0	1	0 (1)	55,6 (2)	2	55,6	2
Sulfoxaflor	60	87,6 (3)	100,0 (4)	-	4*	100,0	4*	100,0 (4)	-	4*	100,0	4*

Cuando no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P \geq 0,05$), se asignó el valor 0 en efecto letal y 1 en efectos subletales. Entre paréntesis se da la clasificación individual de los parámetros evaluados, según las categorías toxicológicas de la OILB en condiciones de laboratorio respecto el control: 1=inocuo (<30%), 2=ligeramente tóxico (30-79%), 3=moderadamente tóxico (80-99%) y 4=tóxico (>99). **Mc**: mortalidad corregida a las 72 h por la fórmula de Schneider-Orelli. **S_c**: Supervivencia de ninfas expuestas a los residuos de insecticida corregida por la fórmula de Abbott. **R_c**: Reproducción corregida por la fórmula de Abbot. **CM**: Categoría según el efecto de mayor impacto. **ET**: Efecto total. **CT**: Clasificación teniendo en cuenta el efecto total. -: No fue posible evaluar este parámetro.

*Clasificación toxicológica sin efectos subletales.

4.4.2. Exposición de adultos a residuo vegetal. Evaluación de persistencia

4.4.2.1. Residuo fresco

4.4.2.1.1. Efecto letal

En la exposición al residuo fresco sobre hoja de tomate, solo se observó un efecto de choque a las 24 h en el tratamiento de sulfoxaflor con un valor en la mortalidad del $97,3\% \pm 2,7$ ($F = 420,84$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$) (**Figura 24**); la mortalidad en el tratamiento de agua fue de $1,3\% \pm 1,3$. A las 72 horas de evaluación, los residuos de deltametrina y metaflumizona incrementaron significativamente su toxicidad produciendo porcentajes de mortalidad del $48,0\% \pm 17,3$ y $86,7\% \pm 4,7$ respectivamente siendo la del control de $22,7\% \pm 16,1$ ($F = 18,63$; $df = 6, 34$; $P < 0,0001$). Al igual que en el ensayo sobre residuo inerte, los otros insecticidas no tuvieron impacto letal en el depredador.

Figura 24 Mortalidad de adultos de *Nesidiocoris tenuis*, tras la exposición a residuos frescos (0 DDT) de diferentes insecticidas sobre hoja de tomate. Los valores son la media $\pm$ ES de cinco repeticiones ($N = 15$). Las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 24 h (efecto de choche, mayúsculas) o 72 h (mortalidad acumulada, minúsculas) de exposición, con un nivel de significación de $P < 0,05$.

4.4.2.1.2. Efecto en la reproducción

En general para esta especie de depredador, el número de ninfas por hembra y día tiene un comportamiento irregular dentro de las unidades experimentales aumentando el error estándar. Por esta razón, aunque el residuo de deltametrina fue el que registró el menor número de ninfas por hembra y día ($2,2 \pm 0,8$) respecto al control ($5,2 \pm 0,8$), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($F = 2,30$; $df = 4, 59$; $P = 0,0704$) (Figura 25).

Figura 25 Efecto en la reproducción de adultos expuestos al residuo fresco de diferentes insecticidas sobre tejido vegetal (hoja de tomate). Los valores corresponden a la media $\pm$ ES de 12 repeticiones (N = 1 macho y 1 hembra).

4.4.2.1.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas (residuo fresco sobre sustrato vegetal)

Después de calcular el efecto total causado por los insecticidas se encontró un efecto negativo en los tratamientos de metaflumizona y sulfoxaflor (**Figura 26**). El resto de los productos fueron inocuos (categoría OILB 1) y por tanto fueron clasificados como productos no persistentes. Sin embargo, debido a que la toxicidad inicial (0 DDT) del residuo de deltametrina tuvo una mortalidad superior al control y una reducción en el número de ninfas por hembra y día, aunque sin diferencias significativas en ambos casos, se decidió evaluar el residuo de 4 DDT.

Figura 26 Efecto total de los insecticidas tras exponer a los adultos de *Nesidiocoris tenuis* al residuo fresco sobre sustrato vegetal (hoja de tomate).

¹Concentración (mg i.a./L) del producto. Cuando no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P \geq 0,05$), se asignó el valor 0 en efecto letal y 1 en efectos subletales. **Mc**: mortalidad corregida a las 72 h por la fórmula de Scheider-Orelli. **R_c**: Reproducción corregida por la fórmula de Abbot. -: No fue posible evaluar este parámetro. **OILB**: Clasificación del producto según las categorías toxicológicas de la OILB en condiciones de laboratorio extendido respecto el control: 1= inocuo (<25%), 4= tóxico (>75%). *Clasificación sin uno de los efectos subletales.

4.4.2.2. Residuos envejecidos en invernadero

Cuando se expusieron los adultos del depredador al residuo de 4 DDT, se volvió a observar un efecto de choque (mortalidad 24 h) por parte del residuo de sulfoxaflor ($F = 53,78$; $df = 3, 16$; $P < 0,001$). Este patrón se volvió a repetir cuando se analizó la mortalidad total acumulada a las 72 h de exposición ($F = 85,74$; $df = 3, 16$; $P < 0,0001$). Metaflumizona no tuvo un efecto de choque ($25,3\% \pm 4,4$), pero si un efeco en la mortalidad acumulada ($6,3\% \pm 7,9$) (**Figura 27**).

Figura 27 Mortalidad de adultos de *Nesidiocoris tenuis*, tras la exposición a residuos de 4 DDT de diferentes insecticidas sobre sustrato vegetal. Mortalidad a las 24 h (efecto de choque) y mortalidad acumulada a las 72 h. Los valores son la media de cinco repeticiones (N = 15). Las medias $\pm$ ES por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 24 h (mayúsculas) o 72 h (minúsculas) de exposición, con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

En la **Tabla 9** se muestran los valores del efecto letal que produjeron los residuos envejecidos de metaflumizone y sulfoxaflor a las 24 y 72 horas de exposición. Solo se observó un efecto de choque por el residuo de sulfoxaflor a los 10 DDT. Sin embargo, la mortalidad acumulada se vió afectada a los 10, 23 y 34 DDT por ambos compuestos ($24\ h \rightarrow 10\ DDT$: $F = 29,64$; $df = 2, 12$; $P < 0,0001$ a las 24 h; 23 DDT: $F = 0,06$; $df = 2, 12$; $P = 0,9432$; 34 DDT: $F = 0,64$; $df = 2, 12$; $P = 0,6405$ y $72\ h \rightarrow 10\ DDT$: $F = 117,50$; $df = 2, 12$; $P < 0,0001$; 23 DDT: $F = 64,68$; $df = 2, 12$; $P < 0,0001$; 34 DDT: $F = 32,31$; $df = 2, 12$; $P < 0,0001$)

Respecto a la reproducción, no se observaron diferencias entre el control ($3,8 \pm 0,6$ ninfas por hembra y día) y metaflumizona ($2,2 \pm 0,4$ ninfas) en el residuo de 10 DDT ($U = 40,0$; $P = 0,07$) pero si en el de 23 DDT: control ($3,8 \pm 0,6$ ninfas emergidas por hembra y día) y metaflumizona ($1,9 \pm 0,4$ ninfas emergidas por hembra y día) ($t = 2,7007$ y $P = 0,013$).

Tabla 9 Mortalidad (%) de los adultos de *Nesidiocoris tenuis* a las 24 h y 72 h de exposición de residuos de 10, 23 y 34 días después de tratados sobre hoja de tomate.

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	10 DDT	
		24 h	72 h
Control	-	$0,0 \pm 0,0$	$5,3 \pm 2,5$
Metaflumizona	240	$6,7 \pm 3,6$	$36,0 \pm 8,0$
Sulfoxaflor	60	$48,0 \pm 7,7$ b	$100,0 \pm 0,0$ c
23 DDT			
Control	-	$5,3 \pm 3,3$	$5,3 \pm 5,3$
Metaflumizona	240	$5,3 \pm 3,3$	$33,3 \pm 2,1$
Sulfoxaflor	60	$6,7 \pm 3,6$	$82,7 \pm 7,5$
34 DDT			
Control	-	$2,0 \pm 2,0$	$4,2 \pm 2,6$
Metaflumizona	240	$5,2 \pm 2,3$	$52,3 \pm 9,9$
Sulfoxaflor	60	$3,9 \pm 2,6$	$68,2 \pm 3,1$

En resumen, a partir de los resultados de toxicidad en cada uno de los residuos evaluados, los productos deltametrina, flonicamida, flubendiamida y spirotetramat fueron clasificados como no persistentes, pues en todos los casos fueron inocuos a los 0 DDT. Debido a que en el

residuo de 4 y 34 DDT no fue posible evaluar efectos subletales y que a los 10 DDT no se encuentran diferencias en la reproducción entre metaflumizona y el control (agua), los productos se clasifican en la misma categoría toxicológica según ambos criterios de clasificación (máxima clasificación de los parámetros evaluados y efecto total). En el residuo de 23 DDT, donde se encontraron diferencias en el parámetro reproductor entre el control y metaflumizona, este insecticida se clasifica con la misma categoría toxicológica de ligeramente tóxico aunque el valor del efecto total se encontró muy cerca de la categoría OILB 3 (mortalidad corregida del 29,6% y efecto total del 50%). Finalmente, los residuos de metaflumizona y sulfoxaflor tuvieron una clasificación de persistentes (categoría OILB D), tras mantener su toxicidad hasta los 34 DDT (**Tabla 10**).

Tabla 10 Clasificación toxicológica de los insecticidas evaluados tras exponer a los adultos de *Nesidiocoris tenuis* al residuos envejecidos en invernadero sobre sustrato vegetal (hoja de tomate).

4 DDT				
Compuesto	Concentración			
	mg i.a./L	Mc	Rc	Clasificación OILB
Metaflumizona	240	64,8	-	3*
Sulfoxaflor	60	100,0	-	4*
10 DDT				
Metaflumizona	240	32,4	1	2
Sulfoxaflor	60	100,0	-	4*
23 DDT				
Metaflumizona	240	29,6	29,3	2
Sulfoxaflor	60	81,7	-	4*
34 DDT				
Metaflumizona	240	52,3	-	3*
Sulfoxaflor	60	66,8	-	3*

Cuando no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P \geq 0,05$), se asignó el valor 1 en efectos subletales. **Mc**: mortalidad corregida a las 72 h por la fórmula de Schneider-Orelli. **Rc**: Reproducción corregida por la fórmula de Abbot. Clasificación OILB según las categorías toxicológicas de la OILB en condiciones de laboratorio extendido respecto el control: 2=ligeramente tóxico (25% - 50%), 3=moderadamente tóxico (51%-75%), 4= tóxico (>75%).

4.5. Discusión

Las larvas y ninfas de los depredadores suelen considerarse la etapa de desarrollo más susceptible y expuesta a los plaguicidas (Hassan 1994, Medina et al. 2001). Sin embargo, tras la exposición residual a los insecticidas evaluados sobre sustrato inerte, los adultos de *N. tenuis* fueron claramente más vulnerables que las ninfas de tercer estadio a esta forma de contaminación. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores. Así, Arnó y Gabarra (2011) observaron que en condiciones de laboratorio extendido el insecticida indoxacarb tenía un efecto letal más severo en los adultos de *N. tenuis* y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) (anteriormente conocido como *Macrolophus caliginosus*), que en las ninfas de tercer y cuarto estadio y Amor (2013) también observó una mortalidad a las 72 horas mucho mayor en los adultos de *N. tenuis* que en las ninfas de segundo estadio tras evaluar varios insecticidas por vía residual sobre sustrato inerte.

Probablemente, los adultos de *N. tenuis* son más susceptibles por su mayor movilidad a pesar de que su mayor talla o menor superficie corporal relativa (proporción de superficie respecto al volumen) les permite, en principio, neutralizar mejor la entrada del tóxico por contacto que a las ninfas. En el laboratorio se observó que eran mucho más activos que las ninfas, por lo que al desplazarse sobre superficies tratadas se contaminaban más. Esta situación podría repetirse en las condiciones reales de campo. Aunque los adultos pueden volar, pasan mucho tiempo en las hojas del cultivo realizando una caza más activa de la presa que las ninfas. Como la mayoría de los míridos depredadores, *N. tenuis* es una especie omnívora a lo largo de todo su ciclo biológico (dieta zoofitófaga), pero su actividad depredadora se acentúa al avanzar el desarrollo ya que

en las ninfas de primeros estadios predomina la dieta fitófaga y en los adultos la carnívora (Calvo y Urbaneja 2004).

Sin duda, sulfoxaflor fue el producto más nocivo entre los insecticidas ensayados ya que produjo el 100% de mortalidad en ninfas y adultos (sustrato inerte) y adultos (sustrato inerte y vegetal) y fue también persistente, conservando gran parte de su efecto letal hasta los 34 DDT. Se trata también del insecticida más moderno de los evaluados, por lo que existen todavía pocos datos sobre su toxicidad en otros enemigos naturales, la mayoría generados por el grupo de Manejo Integrado de Plagas perteneciente al departamento Producción Agraria de la UPM. En la **Tabla 11** se resumen estos resultados que son muy variables dependiendo de la especie y del estado de desarrollo tratados.

En ensayos de laboratorio aplicando la metodología de la OILB, Garzón et al. (2015) clasificaron este producto como inocuo en larvas (L₃) de *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) y adultos de *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae); mientras que sobre adultos de *C. carnea* fue clasificado como ligeramente tóxico y en larvas (L₄) de *A. bipunctata* resultó ser un compuesto tóxico. Por otro lado, Fernández et al. (2015) en ensayos sobre *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) lo clasifican como tóxico en laboratorio para el estado protegido (pupas parasitadas de mosca blanca) y en adultos del parasitoide, tanto sobre sustrato inerte como vegetal siendo además persistente (ensayos realizados con una radiación fotosintéticamente activa de $640,9 \pm 18,0$ y luz UV de $29,146 \pm 1,17 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$). En otra especie, el ácaro fitoseido *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) se clasificó como un producto inocuo en laboratorio tanto en huevos como en adultos (Fernández 2016) (**Tabla 11**). De igual forma, la susceptibilidad

de los móridos a sulfoxaflor parece ser alta, ya que en ensayos de exposición residual la dosis letal del 50% de la población fue 12 veces mayor para el díptero *Drosophila melanogaster* Meigan (Drosophilidae) y 18 veces mayor para *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) respecto al mórido fitófago *Lygus hesperus* (Knight) (Babcock et al. 2011).

Tabla 11 Clasificaciones toxicológicas de sulfoxaflor en diferentes sustratos, especies y estados de desarrollo.

Ensayo	<i>C. carnea</i> ¹		<i>A. bipunctata</i> ¹	
	Larva L3	Adulto	Larva L4	Adulto
Laboratorio (sustrato inerte)	1	2	4	1

Ensayo	<i>E. mundus</i> ²		<i>A. swirskii</i> ³	
	Pupa	Adulto	Huevo	Adulto
Laboratorio (sustrato inerte)	4	4	1	1
Laboratorio (sustrato vegetal)	-	4	-	-
Persistencia	-	D	-	-

Ensayo: Laboratorio (sustrato inerte), Lab. Extendido y persistencia (sustrato vegetal)

¹Garzón et al. (2015), ²Fernández et al. (2015), ³Fernández (2016). Categorías toxicológicas de la OILB: 1=inocuo, 2=ligeramente tóxico y 4=tóxico. Categorías de persistencia de la OILB: D=persistente

El control estándar, deltametrina, no tuvo un impacto severo en *N. tenuis*. Sin embargo, se clasifica como un producto tóxico en otras especies de depredadores pertenecientes a la familia Miridae [*M. pygmaeus*, *Cyrtorhinus lividipennis* (Reuter) (Solans e Izquierdo 1997) o en otros chinches depredadores como *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae)] (Preetha et al. 2010). Además, es un insecticida que está clasificado como un compuesto tóxico (categoría OILB 4) para las ninfas y los adultos de *M. pygmaeus* cuya toxicidad se mantiene entre los 8 y 12 DDT (Koppert 2016c).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con el trabajo de Amor (2013), quien también empleó este piretroide como control positivo para evaluar la toxicidad de diferentes insecticidas sobre los depredadores *N. tenuis* y *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae). En el antocórido, sobre sustrato inerte y vegetal, deltametrina fue un producto letal (categoría OILB 4) tanto en ninfas N₂, como en adultos y además fue clasificado como un producto persistente (categoría OILB D), por tanto no fue posible estimar efectos subletales. Sin embargo, en *N. tenuis* se obtuvieron resultados similares a los presentados en este trabajo, ya que no tuvo efecto letal en las ninfas de segundo estadio a las 72 h de exposición sobre residuo inerte, pero a los 10 días de exposición fue clasificado como ligeramente tóxico. En adultos fue clasificado como un producto ligeramente tóxico (categoría OILB 2) en los sustratos inerte y vegetal, además de poco persistente (categoría OILB A).

Por tanto, *N. tenuis* parece tener menor susceptibilidad a la contaminación con residuos de deltametrina que otros chinches depredadores. En el mismo sentido, Solans e Izquierdo (1997) registraron una susceptibilidad mucho menor del mírido *Diciphus tamanini* Wagner (Hemiptera: Miridae)

en comparación con *M. pygmaeus*, tras exponer ninfas N₃ al residuo fresco sobre sustrato inerte y vegetal (hojas de tomate).

En el presente trabajo, el residuo fresco de metaflumizona no afectó a las ninfas pero sí produjo una mortalidad significativa en los adultos de *N. tenuis*. A diferencia de sulfoxaflor, no se observó un efecto de choque a las 24 h, manifestándose su toxicidad a las 72 h tanto en los residuos sobre sustrato inerte como en hoja de tomate. Además, fue un insecticida persistente ya que retuvo parte de su toxicidad hasta los 34 DDT. Según Tomlin (2009), se trata de una materia activa que aunque actúa por contacto es más activa por ingestión, lo que puede explicar la mayor toxicidad observada en el sustrato vegetal, ya que en estas condiciones se da una doble contaminación (residual e ingestión) por la alimentación zoofitófaga del mío y las propiedades translaminares del producto.

Aunque la metaflumizona tiene una rápida degradación en el medio ambiente (suelo) (Martínez 2012), en planta puede ser diferente, ya que sobre plantas de algodón, tomate y col, el residuo más importante que se encuentra en estudios de persistencia es el compuesto original (Tomlin 2009). Esta falta de degradación del producto en tomate podría ser la razón de su prolongada actividad residual.

Metaflumizona parece tener efectos diferentes según la especie de enemigo natural evaluado. De acuerdo con los resultados de Fernández et al. (2015), este producto es inocuo (categoría OILB 1) vía contaminación directa para el estado protegido del parasitoide *E. mundus* (momias parasitadas de *B. tabaci*) y ligeramente tóxico (categoría OILB 2) en adultos expuestos durante 72 horas a sustrato inerte contaminado. Sobre el depredador *A. swirskii*, la contaminación directa de huevos resultó inocua

(categoría OILB 1) para los parámetros de eclosión de huevos, mortalidad de ninfas, fecundidad y fertilidad de adultos. El mismo comportamiento inocuo se obtuvo cuando se evaluó la mortalidad (72 horas y 7 días), la fecundidad y la fertilidad de adultos expuestos al residuo fresco sobre sustrato inerte (Fernández 2016).

En estudios de Gradish et al. (2011), el insecticida metaflumizona fue clasificado como un producto ligeramente tóxico (categoría OILB 2) para los adultos de *Eretmocerus eremicus* (Rose & Zolnerovich) (Hymenoptera: Aphelinidae) tras evaluar la mortalidad a las 48 horas sobre el residuo fresco en hojas de judía. Sin embargo, en el mismo ensayo, este producto fue inocuo (categoría OILB 1) para los adultos de *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) y *A. swirskii* cuando fueron expuestos a la máxima y al doble de la dosis máxima recomendada en campo. Garzón et al. (2015) no encontraron efectos negativos en la pupación, emergencia de adultos, mortalidad acumulada (larvas + pupas + adultos) o fertilidad cuando larvas L₃ de *C. carnea* o L₄ de *A. bipunctata* fueron expuestas al residuo fresco de metaflumizona sobre sustrato inerte ni tampoco en la mortalidad a las 72 h de exposición, fecundidad o fertilidad de adultos de ambas especies.

Sin embargo, Biondi et al. (2012) registraron una mortalidad cercana al 87% en los adultos de *O. laevigatus* tras estar expuestos a residuo fresco sobre hoja de tomate, manteniéndose la actividad a los 7 DDT y perdiendo su toxicidad a los 14 DDT, pero en ninguno de los residuos evaluados se produjeron efectos adversos en la descendencia. Estos últimos ensayos se mantuvieron en condiciones naturales de luz (Catania, Italia; septiembre 2010), a una temperatura media de 26,2 °C y humedad relativa media de 61,9%. La diferencia en el comportamiento de este producto entre los

diferentes estudios, puede deberse a las condiciones ambientales entre las que se encuentra la radiación solar.

Los residuos de flonicamida, flubendiamida y spirotetramat en sustrato inerte resultaron inocuos para las ninfas y ligeramente tóxicos para los adultos, en este caso por su efecto en la reproducción. Sin embargo, al evaluar los efectos en adultos expuestos al residuo fresco sobre sustrato vegetal, no se observó efecto sobre la descendencia. Diversos trabajos corroboran estos resultados respecto a la compatibilidad de estos insecticidas con la fauna auxiliar, en particular los de Garzón et al. (2015), Fernández et al. (2015) y Fernández (2016) en las especies anteriormente indicadas.

Jalali et al. (2009) observaron un comportamiento inocuo respecto a la mortalidad de larvas L₄ y adultos del depredador *A. bipunctata* expuestos al residuo de flonicamida sobre sustrato inerte, incluso a una dosis 10 veces mayor a la recomendada en campo. Por otra parte, Cloyd y Dickinson (2006) evaluaron el residuo fresco de flonicamida sobre adultos de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) y *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae), sin observar ningún efecto en la mortalidad a las 72 h de exposición para ninguno de las dos especies. Tampoco se encontró efecto negativo en la parasitación, o en la descendencia de los adultos de *L. dactylopii* expuestos al producto (no fueron evaluados los efectos subletales sobre *C. montrouzieri* en dicho ensayo).

Flubendiamida tiene una especificidad sobre el orden Lepidoptera muy alta (Lahm et al. 2009) y no parece tener actividad letal o subletal en otros órdenes (Gentz et al. 2010). Residuos frescos de este insecticida en ensayos

de laboratorio no afectaron a los himenópteros *Cotesia glomerata* L., *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), *Encarsia formosa* Graham (Hymenoptera: Aphelinidae) (Tohnishi et al. 2005), *Chelonus inanitus* L. y *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) (Medina et al. 2012) o al depredador *Neoseiulus fallacis* (Garman) (Acari: Phytoseiidae) (Lefebvre et al. 2012).

Algo similar ocurre con el producto spirotetramat, cuyo modo de acción es la inhibición de la síntesis de lípidos y por tanto influye como regulador del crecimiento y sobre la fertilidad de los individuos (Sáenz de Cabezón et al. 2007, Lefebvre et al. 2012). Aunque Tomlin (2009) señala que este producto puede producir efectos sobre la fecundidad, dicho efecto solo se observó tras exponer a los adultos de *N. tenuis* al residuo fresco sobre sustrato inerte. De igual forma, Moens et al. (2011) evaluaron este insecticida sobre larvas de *Episyrphus balteatus* de Greer (Diptera: Syrphyidae), obteniendo una clasificación OILB 1 (inocuo) tanto para la mortalidad en larvas tratadas como para la reproducción de los adultos.

Al comparar la clasificación toxicológica de los productos de acuerdo con los dos criterios empleados: **1)** categoría según el mayor impacto del efecto letal o de la reproducción y **2)** categoría según el efecto total, que integra ambos efectos, las clasificaciones son coincidentes para todos los productos, excepto en el caso de deltametrina, en residuo fresco sobre sustrato inerte. Este insecticida, en ninfas fue inocuo según el primer criterio, pero al unir el incremento en la mortalidad y la reducción en la reproducción, se clasificó como ligeramente tóxico. Igualmente en adultos, pasa de ligeramente tóxico por su impacto en la reproducción (reducción del 69,3 %) a moderadamente tóxico, al considerar también su efecto letal (incremento del 35,9 %).

Por tanto, ya que la mortalidad y la capacidad benéfica son los dos parámetros recomendados por la OILB para la evaluación del impacto de un plaguicida, la integración de estos valores en una sola fórmula de efecto total parece más recomendable que la clasificación basada en uno de los dos valores, ya que aporta una información más real y completa de los efectos negativos observados.

Sin embargo, cuando el efecto letal del producto fue moderado, como por ejemplo en el caso del tratamiento metaflumizona en adultos, la baja supervivencia a las 72 h no permitió evaluar el parámetro de reproducción, clasificándose como ligeramente tóxico por su efecto letal. Esta clasificación no es comparable a la obtenida con el efecto total para deltametrina, ya que desconocemos si metaflumizona podría tener impacto en la capacidad benéfica del depredador.

Capítulo V. Toxicidad de modernos insecticidas por contacto residual sobre *Nesidiocoris tenuis* en condiciones de semicampo

5.1. Introducción

Siguiendo el esquema secuencial propuesto por la OILB, el siguiente paso a la etapa de laboratorio es la de semicampo. En esta etapa se utilizan plantas en invernadero o plantas al aire libre a pequeña escala y confinadas en jaulones. Las premisas en esta fase son (Hassan 1992, 1994, Sterk et al. 1999):

- Los factores climáticos deben ser los reales, manipulándose lo menos posible. No obstante, en campo está permitido utilizar una cubierta para la lluvia si es necesario.
- El momento de aplicación, el cultivo y la estación deben ser los apropiados para el producto químico a evaluar, escogiendo siempre las condiciones más desfavorables para los organismos.
- Cuando sea necesario, los experimentos se pueden repetir en diferentes condiciones climáticas.
- Si es posible, los organismos beneficiosos (preferiblemente el estado más susceptible) deben estar presentes en el cultivo durante la aplicación o ser liberados inmediatamente después del tratamiento.
- Los individuos, ya sean procedentes de crías de laboratorio o capturados en campo, deben tener una edad uniforme.
- Se debe utilizar la máxima concentración recomendada en campo del plaguicida.

- La aplicación debe hacerse de acuerdo con las buenas prácticas agrícolas recomendadas.
- Los organismos deben tener un periodo de exposición adecuado antes de la evaluación de los efectos.
- Es necesario el uso de un tratamiento control (agua) y un control estándar (plaguicida) en cada experimento.
- Debe evaluarse el efecto en la capacidad benéfica, que en semicampo se especifica como la evaluación de la oviposición, tasa de parasitismo, consumo de presa o cambios poblacionales.
- Las categorías de clasificación del producto según el porcentaje de mortalidad o reducción en la capacidad benéfica son: 1=inocuo (<25%), 2=ligeramente tóxico (25-50%), 3=moderadamente tóxico (51-75%) y 4= tóxico (>75%).

Los ensayos de semicampo (en comparación con los de laboratorio), presentan una ejecución más difícil. Además, al tratarse de condiciones más reales, el enemigo natural tiene mayor probabilidad de supervivencia al estar confinado en un espacio más amplio y encontrarse los residuos expuestos a un ambiente más similar al real, en especial a la luz solar.

En este capítulo se han evaluado los mismos insecticidas que se estudiaron en condiciones de laboratorio, independientemente de su clasificación toxicológica. Esto se debe fundamentalmente a dos razones: **1)** debido a la dieta mixta de *N. tenuis*, se consideró que al tratar la planta de tomate, en el caso de los insecticidas sistémicos y translaminares, la contaminación por ingestión podría ser más importante que en laboratorio. Además, siguiendo las recomendaciones para la etapa de semicampo, se amplió el estudio del impacto en la capacidad benéfica de *N. tenuis*, al incluir la

evaluación del consumo de presa. Para ello, se analizó el consumo a diferentes densidades de presa y con los resultados obtenidos se modelizó la respuesta funcional de los individuos.

Eveleigh y Chant (1981) y Sabelis (1985) describen la respuesta funcional como la relación entre la densidad de la presa y el número de presas atacadas por un único individuo (depredador o parasitoide) en una unidad de tiempo determinada, donde el consumo de presas (tasa de ataque) se da en respuesta al incremento en la densidad de las mismas y puede emplearse para predecir la eficacia del control biológico en determinadas condiciones (Oaten y Murdoch 1975, Riechert y Lockley 1984), comprender como se ve afectada la disminución de la plaga en relación con el depredador (Martinou y Stavrinides 2015) y estimar parámetros que describen el comportamiento de búsqueda del mismo (Hassell et al. 1977, Murray et al. 2013).

Los tipos de respuesta funcional descritos para la relación presa-depredador son (**Figura 28**):

- 1. Tipo I:** el número de presas atacadas se incrementa de manera proporcional al número de presas disponibles hasta alcanzar un valor máximo. A partir de ese punto, la tasa de ataque permanece constante, independientemente del incremento en la densidad de presa (Juliano 2001). Un ejemplo son los depredadores pasivos, donde todas las presas que caen en la trampa son devoradas.
- 2. Tipo II:** en este caso, la tasa de ataque aumenta con la densidad de la presa, pero la velocidad en el consumo disminuye con el tiempo, hasta alcanzar una asíntota en la cual la tasa de ataque permanece

constante e independiente de la densidad de presa ofrecida. Dicha disminución en la velocidad se debe a que el enemigo natural utiliza una parte del tiempo en la manipulación (captura, muerte, ingesta y digestión) de cada presa (Th) y en su preparación para la siguiente búsqueda. A medida que aumenta la densidad de las presas, el tiempo de búsqueda disminuye, pero el tiempo de manipulación permanece constante (Holling 1959, Juliano 2001).

3. **Tipo III:** es una respuesta muy parecida a la tipo II, pero a bajas densidades se pierde eficacia en la captura de la presa (por ejemplo debido a la existencia de refugios para la plaga). La figura es una curva sigmoidea que se eleva hasta alcanzar una asíntota similar a la de la respuesta funcional tipo II. Este tipo de respuesta se da habitualmente cuando el enemigo natural mejora su capacidad benéfica con incrementos de la densidad de la presa, bien porque se incrementa su capacidad de búsqueda o se reduce el tiempo de manipulación (Holling 1959, Juliano 2001).

Figura 28 Tipos de respuesta funcional utilizados para explicar la relación del predador y la presa. N : densidad de la presa ofrecida. N_c : densidad de la presa consumida.

5.2. Objetivos

Los objetivos del capítulo fueron:

- Evaluar la toxicidad aguda del residuo fresco de los insecticidas en adultos de *N. tenuis* en condiciones de semicampo.
- Estimar el efecto causado en la reproducción del depredador después de estar expuesto a los residuos de diferentes insecticidas durante 72 h.
- Establecer el efecto residual de los insecticidas en el consumo y en el tipo de respuesta funcional de los adultos de *N. tenuis*.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Efecto en la mortalidad y la reproducción

Como se describió en la sección 4.3.3.1., las plantas de tomate (50 cm de altura) se trataron con los productos hasta punto de goteo. Una vez seco el residuo, se introdujeron en jaulas entomológicas diseñadas por González-Núñez (1998). Estas jaulas tenían una base cuadrada de color blanco (25 cm de lado) y marcos de madera (60 cm de altura). Presentaban tres lados laterales y la parte superior cubiertos por visillo, lo que permitía la ventilación de la unidad experimental, y un cuarto lado lateral de metacrilato transparente que facilitaba la observación del interior de la misma para monitorizar el experimento (**Figura 29**). Como fuente de proteína animal se utilizaron 0,5 g de huevos de *E. kuehniella* en un comedero de aluminio que colgaba a media altura de la planta. Se

emplearon cuatro repeticiones por tratamiento, cada una con 30 adultos del depredador.

Para este ensayo no fue posible utilizar el sistema de riego disponible en el invernadero, por lo que el sustrato se mantuvo húmedo con un plato de plástico con suficiente agua para los tres días que permaneció la planta en la jaula.

Figura 29 Exposición residual en condiciones de semicampo (invernadero). a) Detalle de pulverización hasta punto de goteo. b) Detalle de la unidad experimental dentro del invernadero (lateral de metacrilato transparente).

La mortalidad se evaluó a las 72 h de exposición. Pasado este tiempo, se recuperaron los adultos supervivientes y se transportaron al laboratorio en cajas de plástico libres de residuo. Para evaluar el efecto de los insecticidas en la reproducción, se utilizó la misma metodología que en los ensayos de contaminación residual en condiciones de laboratorio (sección 4.3.2.3.).

5.3.2. Efecto en el consumo de presa

Para estimar el efecto en el consumo y poder establecer el tipo de respuesta funcional de *N. tenuis* fue necesario realizar un ensayo preliminar en el cual se estableció la metodología a emplear para la preparación de los grupos de huevos de dos especies presa y se eligió la más fiable para la evaluación del consumo (selección de presa).

Antes de iniciar la evaluación del impacto de los insecticidas en el consumo de presa, se comparó el consumo del depredador con huevos de la presa natural *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) y con huevos de la presa alternativa *E. kuehniella*. La cría de ambas especies se mantuvo en las condiciones del insectario (sección 3.1.1.) siguiendo la metodología de Marco (1994).

La obtención de la puesta y preparación de los huevos según la densidad a evaluar se realizó de la siguiente forma:

- *Spodoptera exigua*: se mantuvieron entre 20 y 30 adultos en una bolsa de papel blanco y se alimentaron con una solución de agua-miel al 25% impregnada en un algodón (**Figura 30**). Pasadas 48 h, se cortaron los trozos de papel con los plastones de huevos puestos por las hembras. Utilizando un pincel fino y bajo una lupa binocular (Leica® MZ6), los huevos se limpiaron de las sedas procedentes de la hembra al hacer la puesta y se prepararon en una sola capa teniendo en cuenta las densidades a evaluar.

Figura 30 Bolsas de papel utilizadas para la obtención de plastones de huevos de *Spodoptera exigua*.

- *Ephestia kuehniella*: los adultos (50 aproximadamente) se introdujeron en la parte superior de una caja de plástico (18 cm de largo x 7,5 cm de altura x 11 cm de profundidad) dividida transversalmente por una malla (tamaño del poro: 1mm) de forma que a través de la misma, las hembras ponían los huevos que caían a la base de la caja. Por medio de una lupa binocular (Leica® MZ6) y un pincel fino se separaron y contaron uno a uno los huevos hasta completar las densidades a evaluar en el ensayo, adhiriéndolos a una cartulina de plástico color negro con goma de tragacanto al 3% (Manuel Riesgo S.A., España) (**Figura 31**).

Figura 31 Caja para la obtención de huevos de *Ephestia kuehniella* mostrando la subdivisión interna de la zona de adultos (superior) y huevos (inferior).

Como unidad experimental se utilizaron cajas de plástico (12 cm de diámetro x 5 cm de altura) con ventilación en la parte superior (5,5 cm de diámetro), un lote de huevos de la presa (teniendo en cuenta la densidad a evaluar) y una hembra del depredador *N. tenuis* (< 72 h desde la emergencia) proveniente de la cría, la cual permaneció en condiciones de ayuno durante 48 h, periodo en el cual estuvo solo en contacto con una judía verde fresca. En este caso se utilizaron solo hembras ya que tienen más gasto de energía y necesitan consumir mayor cantidad de presa que los machos (van Aplen y Jervis 1996) y no se suministró una fuente de líquido (planta o judía verde fresca) con el objetivo de obtener un consumo homogéneo (se realizaron ensayos preliminares donde se evaluó que esta falta de líquido no afectaba al depredador). Las densidades evaluadas fueron 30, 90 y 130 huevos de cada especie, cada una con cinco repeticiones. Los huevos de la presa que perdieron turgencia y se mostraban translucidos (vacíos), fueron considerados como huevos consumidos.

5.3.3. Evaluación del consumo en presa tratada

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos anteriores, se emplearon huevos de *E. kuehniella* como presa y los productos que causaron una mortalidad inferior al 50% con el residuo fresco sobre planta. Utilizando nuevamente la metodología descrita en el apartado 4.3.3.1, se aplicó cada producto sobre plantas de tomate (30 cm de altura, BBCH: 17); sin embargo, en este caso se utilizaron unidades experimentales diferentes. Una vez seco el residuo sobre las plantas, estas se cubrieron con una malla de agrotexil (Projar S.A., España), cuya base estaba sujeta a la maceta de la planta con cinta americana (Thomann, España) y la parte superior con gomas elásticas (**Figura 32**). Es importante resaltar que se realizaron

ensayos preliminares para verificar que la planta no se veía afectada por la cubierta, de forma que no se aumentó la humedad relativa y por tanto no se observó un crecimiento de hongos ni se debilitó la planta durante el periodo del ensayo.

Figura 32 Unidad experimental utilizada en los ensayos de efecto en el consumo y respuesta funcional sobre plantas de tomate cubiertas por agrotextil.

Debido a la toxicidad de algunos productos vía residual fue necesario liberar dos hembras de edad uniforme (< 72 h después de la emergencia) por cada planta tratada. En el caso que ambas hembras estuviesen vivas pasadas 36 h de exposición y ayuno proteico, se retiró una de las hembras; cuando ambas estuvieron muertas se eliminó esa repetición. Después del periodo de ayuno (36 h), se añadió sobre el sustrato de la planta (tierra y vermiculita, 2:1) una cartulina de plástico de color negro con la densidad de huevos de *E. kuehniella* a evaluar (30, 90, 120 y 240 huevos). Durante 24 h, las unidades experimentales permanecieron en las condiciones controladas de laboratorio descritas en el capítulo III. Pasado este tiempo,

se registró el número de huevos consumidos. Se utilizaron 10 repeticiones por densidad de huevos e insecticida evaluado.

5.3.4. Análisis de datos

Los porcentajes de consumo obtenidos en el ensayo de la sección 5.3.2.3. se procesaron con un análisis de la covarianza (ANCOVA), utilizando como factor los tratamientos (insecticidas) y como covariable la densidad de la presa ofrecida (30, 90, 120, 240 huevos), este último por tratarse de un factor numérico independiente (del cual se tiene control).

Con los resultados del número de huevos consumidos por densidad se estimó la respuesta funcional. Se utilizaron los modelos sin reposición de presa consumida descritos por Rogers (1972) para el tipo de respuesta II y Hassell et al. (1977) y Hassell (1978) para el tipo de respuesta funcional III, debido a que estos dos tipos de respuesta funcional son de mayor interés para los enemigos naturales que el modelo tipo I (Juliano 2001). Para estimar los valores de tasa de ataque (a) y tiempo de manipulación (T_h), las ecuaciones de respuesta funcional utilizadas fueron (en ambos casos se emplea $T = 24$ h):

- Tipo II

$$N_e = N_0 \{1 - e^{[a(T_h N_e - T)]}\}$$

donde, N_0 es la densidad inicial de presa, a es la tasa de ataque, T_h es el tiempo de manipulación y N_e es el número de presas consumidas.

- Tipo III

$$N_e = N_0 \{1 - e^{[(d+bN_0)(T_h N_e - T)/(1+cN_0)]}\}$$

En este modelo se asume que la tasa de ataque (a) es función de la densidad inicial (N_0) y se obtiene como:

$$a = \frac{d + bN_0}{1 + cN_0}$$

donde, N_0 es la densidad inicial de presa, N_e es el número de presas consumidas, a es la tasa de ataque, T_h es el tiempo de manipulación y b , c y d son constantes. Se empleó la fórmula indicada para la respuesta funcional de tipo III, pero con $d = 0$ tal y como figura en la fórmula inicial descrita en Hassell et al. (1977).

Debido a que N_e se encuentra a ambos lados de la igualdad sin posibilidad de despejarla, se utilizó la función W de Lambert por medio del paquete “frair” del programa estadístico R, que permite estimar los parámetros en este tipo de ecuaciones.

Se ajustaron ambas funciones a los datos de consumo de las hembras de *N. tenuis* de cada tratamiento. Para establecer qué modelo describía mejor la respuesta funcional, se aplicó el “frair test” de R, que permite realizar un test de hipótesis sobre si la respuesta funcional es de tipo II (hipótesis nula) frente a la de tipo III (hipótesis alternativa). La función “frair test” se basa en Juliano (2001) y estima dos modelos de regresión logísticos que relacionan la proporción de presas consumidas y la densidad. El primer modelo establece una relación lineal y el segundo un polinomio de orden 2 (cuadrático). Si la relación funcional es del tipo II, el término lineal debe

ser negativo, mientras que si es del tipo III, el término lineal debe ser positivo y el cuadrático negativo. La función además de analizar el signo de los coeficientes también comprueba si los coeficientes son significativamente distintos de 0.

5.4. Resultados

5.4.1. Efecto letal

En las condiciones de semicampo, los residuos de deltametrina, metaflumizona, spirotetramat y sulfoxaflor incrementaron la mortalidad de los adultos de *N. tenuis* después de 72 h de exposición respecto al tratamiento control ($F = 40,33$; $df = 6, 27$; $P < 0,0001$) (**Figura 33**). Nuevamente sulfoxaflor resultó ser el producto más tóxico alcanzando el $80,8\% \pm 4,4$ de mortalidad, seguido por metaflumizona ($35,5\% \pm 5,4$) y deltametrina ($30,0\% \pm 7,0$). El efecto letal de spirotetramat fue menor del 25% ($15,5\% \pm 4,7$) por lo que se clasificó como inocuo (categoría OILB 1). La mortalidad en el tratamiento de agua fue de $1,0\% \pm 1,0$.

Figura 33 Mortalidad de adultos de *Nesidiocoris tenuis*, tras la exposición a residuos frescos de diferentes insecticidas sobre planta de tomate en condiciones de semicampo. Los valores son la media $\pm$ ES de cuatro repeticiones (N = 30). Las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

5.4.2. Efecto en la reproducción

En el tratamiento control se observaron $4,2 \pm 0,7$ ninfas producidas por hembra y día y aunque con el residuo de deltametrina se observó de nuevo el valor más bajo ($2,8 \pm 0,5$), no fue significativamente distinto respecto al control o al resto de los tratamientos ($F = 0,98$; $df = 5, 67$; $P = 0,4397$) (**Figura 34**).

Figura 34 Efecto en la reproducción de *Nesidiocoris tenuis* tras su exposición durante 72 h a residuo fresco sobre plantas de tomate en condiciones de semicampo. El residuo de sulfoxaflor no se evaluó debido a la alta mortalidad registrada en la evaluación del efecto letal. Los valores son la media $\pm$ ES de doce repeticiones (N = 1 macho y 1 hembra). No se observaron diferencias con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

5.4.3. Efecto en el consumo de presas

En la **Tabla 12** se muestran los datos de consumo de huevos de las dos especies utilizadas. Aunque al comparar las medias entre especies no se evidencian diferencias entre ellas (densidad **30**: $U = 3,0$; $P = 0,504$; **90**: $U = 10,0$; $P = 0,370$; **130**: $U = 1,0$; $P = 0,386$), la tendencia en el consumo fue superior en el caso de *E. kuehniella*, siempre por encima del 90% incluso a la densidad más alta, sin encontrar diferencias significativas entre densidades ($F = 0,67$; $df = 2, 14$; $P = 0,53$). En el caso de *S. exigua*, tampoco hubo diferencias significativas entre las diferentes densidades ($H=3,456$; $P = 0,1794$), pero la respuesta fue menos uniforme ya que el error estándar

fue mayor. De hecho, los huevos de *S. exigua* consumidos no se distinguían bien de los huevos secos y, además, debido a la manipulación del plastón para dejar una sola capa y a su corion delgado, fue fácil perforarlos y por tanto se obtuvo un mayor margen de error en el conteo del consumo. Basándose en estos resultados, se decidió realizar los ensayos de consumo de presa con huevos de *E. kuehniella*.

Tabla 12 Consumo (%) de hembras de *Nesidiocoris tenuis* tras alimentarse de huevos de diferentes especies de presa.

Huevos ofrecidos	<i>E. kuehniella</i>	<i>S. exigua</i>
30	100,0 ± 0,0	93,3 ± 6,7
90	91,8 ± 7,3	68,2 ± 18,0
130	95,6 ± 1,4	60,27 ± 30,4

Las medias de cada tratamiento corresponden a 5 repeticiones ± ES (N= 1 hembra).

5.4.4. Efecto en el consumo en planta tratada

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis preliminar, se eligieron como presa los huevos de *E. kuehniella* a la densidad máxima de 240 huevos. En la **Tabla 13** se muestran los resultados de consumo para los diferentes tratamientos y densidades. Hay que indicar que en este ensayo no se obtuvo una estabilización del consumo a las densidades más altas como cabía esperar, lo que afectó a la modelización de la respuesta funcional.

Tabla 13 Consumo de huevos de *Ephestia kuehniella* por las hembras de *Nesidiocoris tenuis* expuestas al residuo fresco de insecticidas sobre planta de tomate en condiciones de semicampo.

Tratamiento	30 huevos		90 huevos	
	% ¹	n ²	% ¹	n ²
Control	93,3 ± 6,7	28,0 ± 2,0	93,9 ± 2,8	84,5 ± 2,5
Deltametrina	45,3 ± 12,1	13,6 ± 3,6	75,9 ± 10,4	68,3 ± 9,3
Flonicamida	100,0 ± 0,0	30,0 ± 0,0	60,8 ± 13,5	54,7 ± 12,1
Flubendiamida	48,3 ± 14,1	14,5 ± 4,2	50,6 ± 14,6	45,5 ± 13,2
Spirotetramat	60,0 ± 16,3	18,0 ± 4,5	90,2 ± 4,0	81,2 ± 3,6
	120 huevos		240 huevos	
	% ¹	n ²	% ¹	n ²
Control	76,4 ± 10,7	91,8 ± 12,8	71,0 ± 12,8	170,6 ± 30,8
Deltametrina	62,0 ± 13,2	74,4 ± 15,9	56,6 ± 11,7	135,8 ± 28,0
Flonicamida	44,1 ± 13,0	52,9 ± 15,6	61,6 ± 13,3	147,8 ± 32,0
Flubendiamida	69,9 ± 11,5	83,9 ± 13,8	49,2 ± 11,4	118,1 ± 27,4
Spirotetramat	89,3 ± 2,5	107,2 ± 3,0	53,3 ± 10,7	127,9 ± 25,7

Los valores hacen referencia a 10 repeticiones por tratamiento (N = 1 hembra), excepto para la densidad de 240 donde fueron utilizadas 7 repeticiones por tratamiento.

¹Porcentaje medio de huevos consumidos. ²Número medio de huevos consumidos.

En la **Tabla 14** se muestran los resultados del análisis de la covarianza (ANCOVA) con la densidad de huevos como covariable. Los resultados de este análisis indican que la densidad (*D*) no influye en el consumo pero sí el factor insecticida (*I*) y que no hay interacción entre la densidad y el insecticida (*I* × *D*). El consumo medio de las cuatro densidades evaluadas fue mayor en el control (84,7% ± 4,4) que en los tratamientos spirotetramat (74,8% ± 5,5), flonicamida (67,0 ± 6,5), deltametrina (60,2 ± 6,1) y

flubendiamida ($54,9 \pm 6,6$). Según el test LSD de comparación de las medias, el único producto que mantuvo un comportamiento similar al testigo fue spirotetramat.

Tabla 14 Estadísticos del análisis de ANCOVA para el consumo de huevos de *Ephestia kuehniella* por hembras de *Nesidiocoris tenuis* que estuvieron expuestos a residuo fresco de insecticidas sobre planta de tomate en condiciones de semicampo.

Factor	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Insecticida (<i>I</i>)	4, 165	3,15	0,0158
Densidad (<i>D</i>)	3, 165	2,63	0,1070
Insecticida x Densidad (<i>I</i> x <i>D</i>)	12, 165	1,10	0,3570

5.4.5. Efecto en la respuesta funcional

Utilizando los modelos sin reposición de presa consumida, el “fair test” indicó que los tratamientos control, deltametrina y spirotetramat mantenían un comportamiento típico de respuesta funcional tipo II. Para el residuo de flubendiamida, el test indicó que la respuesta funcional fue de tipo III; sin embargo, tras ajustar el modelo descrito por Hassell, el programa no proporcionó valores para ninguno de los parámetros evaluados ni datos de probabilidad para este compuesto. En el caso de flonicamida, no se observó respuesta funcional con los datos analizados debido a que el rango de valores de *N* ensayados no fue suficiente para poder ajustar una curva de respuesta funcional. Además, debido a la alta mortalidad obtenida en las hembras de *N. tenuis* expuestas al residuo de metaflumizona, no fue posible terminar el ensayo de consumo y por tanto, estimar la respuesta funcional.

En la **Tabla 15** se muestran las estimaciones de los parámetros obtenidos por el modelo de respuesta funcional tipo II para el control y los insecticidas deltametrina y spirotetramat. Como se observa, la tasa de ataque (a) se reduce cerca del 50% con el residuo de deltametrina respecto al control, mientras que el tiempo de manipulación (Th) se ve incrementado por el residuo de spirotetramat.

Tabla 15 Parámetros estimados con el modelo sin reposición de presa de la respuesta funcional tipo II para hembras de *Nesidiocoris tenuis* expuestas al residuo fresco de insecticidas sobre plantas de tomate.

Estimación	Parámetro	Estimación	Z value	P
Control	a^1	$0,1156 \pm 0,1154$	21,3757	$< 2,2e-16$
	Th^2	$2,772 \pm 0,33$	8,4138	$< 2,2e-16$
Deltametrina	a^1	$0,0475 \pm 0,0023$	20,9347	$< 2,2e-16$
	Th^2	$2,412 \pm 0,558$	4,3178	$1,576e-05$
Spirotetramat	a^1	$0,099 \pm 0,042$	23,529	$< 2,2e-16$
	Th^2	$4,584 \pm 0,306$	14,816	$< 2,2e-16$

¹Tasa de ataque (número de presas consumidas en una hora). ²Tiempo de manipulación (minutos que una hembra de *Nesidiocoris tenuis* tarda en alimentarse y prepararse para la siguiente búsqueda de presa). Los residuos de flonicamida y flubendiamida no se muestran debido a que en el primer caso no hay evidencia de respuesta funcional, mientras que el segundo fue considerado como respuesta funcional tipo III, aunque no se obtuvieron valores de los parámetros a estimar.

5.4.6. Clasificación toxicológica de los insecticidas

La **Tabla 16** presenta la clasificación toxicológica final de los insecticidas evaluados según los dos criterios utilizados: parámetro con mayor impacto y efecto total. Solo es posible comparar ambas clasificaciones en el caso de deltametrina, ya que en el resto de los productos ambos criterios coinciden. En el caso del piretroide, se clasificó como producto ligeramente tóxico (categoría OILB 2), si bien con la fórmula del efecto total, el valor estuvo próximo al 50%.

Es importante tener en cuenta que la clasificación de metaflumizona como producto ligeramente tóxico (categoría OILB 2) no es un resultado comparable a los otros tratamientos, ya que no fue posible estimar su efecto en el consumo, por lo que deben buscarse otras formas de calcular su impacto en los enemigos naturales por su efecto deletéreo a medio plazo, como se discutirá en el capítulo VII de este trabajo.

Sulfoxaflor fue de nuevo un producto tóxico (categoría OILB 4) por su efecto letal, mientras que el insecticida flubendiamida, al evaluar el efecto en el consumo de presas, se clasificó como un producto ligeramente tóxico (categoría OILB 2).

Tabla 16 Clasificación OILB de los insecticidas para los adultos de *Nesidiocoris tenuis* expuestos al residuo fresco de diferentes insecticidas modernos sobre planta de tomate.

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Semicampo					
		Mc	R _c	C _c	CM	ET	CT
Deltametrina	12,5	29,3 (2)	1	28,9 (2)	2	49,7	2
Flonicamida	60	0 (1)	1	20,9 (1)	1	20,9	1
Flubendiamida	60	0 (1)	1	35,2 (2)	2	35,2	2
Metaflumizona	240	34,8 (2)	1	-	2*	34,8	2*
Spirotetramat	75	15,6 (1)	1	1	1	15,6	1
Sulfoxaflor	60	80,6 (4)	-	-	4*	80,6	4*

Cuando no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P \geq 0,05$), se asignó el valor 0 en el caso de la mortalidad y 1 en el caso de los efectos subletales. Entre paréntesis se da la clasificación individual de los parámetros evaluados, según las categorías toxicológicas de la OILB en condiciones de semicampo respecto el control: 1=inocuo (<25%), 2=ligeramente tóxico (25-50%), 3=moderadamente tóxico (51-75%) y 4=tóxico (>75%).

Mc: mortalidad corregida a las 72 h por la fórmula de Schneider-Orelli. **R_c:** Porcentaje de reducción de la reproducción de adultos expuestos a residuo fresco de insecticidas respecto al control según la fórmula de Abbot. **C_c:** Porcentaje de reducción del consumo de presas respecto al control según la fórmula de Abbott. **CM:** Categoría según el efecto de mayor impacto. **ET:** Efecto total. **CT:** Clasificación teniendo en cuenta el efecto total. -: No fue posible evaluar este parámetro. *: Clasificación sin uno o varios de los efectos subletales.

5.5. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo cumplen con la premisa de la metodología de la OILB según la cual un plaguicida inocuo en laboratorio lo es también en condiciones más reales de semicampo. En efecto, si se mantiene aparte el efecto en el consumo de presa (no evaluado en laboratorio), flonicamida, flubendiamida y spirotetramat continúan siendo categoría 1 respecto a su efecto letal y en la reproducción de adultos de *N. tenuis*; igualmente deltametrina se clasifica como ligeramente tóxico (categoría OILB 2) pero con una mortalidad del 29%, un valor muy próximo al intervalo de categoría OILB 1 (<25%). Por tanto, la alimentación en planta tratada por parte de *N. tenuis* no ha revelado un nuevo efecto tóxico de estos productos, que en caso de producirse habría podido pasar desapercibido en las condiciones de laboratorio. Estos resultados sugieren que en el caso de enemigos naturales con alimentación omnívora, el ensayo de laboratorio con residuo en hoja puede ser suficiente para determinar la inocuidad de los plaguicidas. En el mismo sentido, el efecto letal de metaflumizona y sulfoxaflor fue menor en planta tratada respecto a los resultados de los dos ensayos de laboratorio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, donde flonicamida no tuvo efecto letal, en la revisión de Schnorbach et al. (2008) se citan diversos ensayos de semicampo y campo para los depredadores *Chilocorus nigrinus* (F.), *Coccinella septempunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae); *Anthocoris nemoralis* (Fabricius) (Hemiptera: Anthocoridae), *M. pygmaeus*, *Orius* sp., *Typhlodromus pyri* Scheuten y *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) y para los parasitoides *Aphelinus mali* (Haldeman), *Aphytis lingnanensis* (Compère) (Hymenoptera: Aphidiinae), *Coccidoxenoides* spp, (Hymenoptera: Encyrtidae) y

Trichogramma cryptophlebiae (Nagaraja) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en los que en todos los casos se consideraron los residuos de flonicamida como inocuos respecto a la mortalidad de inmaduros o adultos. Sin embargo, Balachandran et al. (2014) observaron que adultos de *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) expuestos al residuo fresco sobre plantas de algodón (tanto en condiciones de semicampo como condiciones de campo) no sufrieron un incremento en la mortalidad respecto el control, pero sí mostraron una reducción en la fecundidad y fertilidad.

Metaflumizona fue clasificado como ligeramente tóxico (categoría OILB 2) por su efecto letal y no tuvo efecto negativo en el número de ninfas producidas. Sin embargo, por observaciones adicionales al efecto letal, este producto parece tener un efecto deletéreo importante después de las 72 horas de exposición a los residuos. Martinou et al. (2014) no pudieron evaluar los efectos en el comportamiento del depredador *M. pygmaeus* por causar una mortalidad del 80% en ninfas N₅ expuestas a contaminación triple por metaflumizona (directa con gotas del producto, residual sobre plantas de tomate y oral tras alimentarse de huevos de *E. kuehniella* contaminados).

Sulfoxaflor continuó siendo un plaguicida tóxico para *N. tenuis* en condiciones de semicampo por su elevado efecto letal. No se conocen estudios que documenten el impacto de este nuevo insecticida en enemigos naturales en condiciones de semicampo o campo. Únicamente el trabajo de Ghosh et al. (2013) señala que en cultivos de arroz, la aplicación de sulfoxaflor a las dosis de 50, 75 y 100 g i.a./ha, reduce la abundancia de varias especies de míridos, principales depredadores de *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). Sin embargo, los mismos autores señalan

que a pesar de este impacto negativo, la proporción depredador-presa fue favorable para el control biológico de esta plaga.

Se ha demostrado el efecto letal que tienen los residuos de deltametrina en agentes benéficos como sirfidos y coccinélidos en cultivo de trigo (Jansen 2000) o ninfas y adultos del depredador *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Hemiptera: Miridae) junto con arañas depredadoras de las familias Lycosidae, Linyphiidae y Tetragnathidae en el cultivo de arroz (Tanaka et al. 2000). Sin embargo, sobre los adultos de *N. tenuis* no se observó un impacto severo en la mortalidad. Comportamiento similar al observado por May et al. (2003), quienes evaluaron la efectividad de deltametrina contra *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) (Heteroptera: Miridae) en plantas de alfalfa durante tres años, obteniendo un control variable e inconsistente de la plaga a lo largo del tiempo, concluyendo que no todas las especies de chinches son igualmente susceptibles a los residuos de este producto.

La principal ventaja de incluir la evaluación del consumo de presa y de la respuesta funcional en estudios de compatibilidad entre plaguicidas y enemigos naturales es que proporciona información sobre la relación entre el depredador y la presa en los cultivos (Oaten y Murdoch 1975, Riechert y Lockley 1984). La evaluación de la respuesta funcional es de mayor relevancia cuando se utilizan enemigos naturales con un control biológico de tipo aumentativo, especialmente en cultivos de corta duración como el tomate (Wiedenmann y Smith 1997). Sin embargo, hay pocos estudios que hayan investigado el efecto de los insecticidas de nueva generación en la respuesta funcional de los enemigos naturales (Řezáč et al. 2010, Martinou y Stavrinides 2015).

El tipo de respuesta funcional más común en depredadores es el tipo II y se ha estudiado ampliamente en hemípteros como *Orius albidipennis* Reuter (Hemiptera: Anthocoridae) (Gitonga et al. 2002) o más específicamente en míridos, como ninfas N₅ de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* tras alimentarse de huevos de *E. kuehniella* (Martinou y Stavrínides 2015), huevos de *T. absoluta* y mosca blanca (Lampropoulos et al. 2013, Cabello et al. 2015) o ninfas de *T. vaporariorum* (Valderrama et al. 2007) y en adultos de *M. pygmaeus* tras alimentarse de áfidos (Maselou et al. 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo para el tratamiento control confirman que los adultos de *N. tenuis* siguen un modelo de tipo II al incrementarse la disponibilidad de la presa.

El consumo observado en el control fue de casi el 100% a densidades iguales o inferiores a 90 huevos, mientras que a las dos densidades superiores (120 y 240 huevos) fue aproximadamente del 70%. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, Urbaneja et al. (2008) observaron un consumo por hembra de *N. tenuis* del 100% en densidades de 60 huevos de *T. absoluta*. En cambio, para ninfas de quinto estadio, Mollá et al. (2014) registraron un consumo menor (74,3%) a la densidad de 75 huevos de *E. kuehniella*. La respuesta funcional de los tratamientos deltametrina y spirotetramat fue de tipo II al igual que en el control, aunque con una en la asíntota menor (tasa máxima de ataque); sin embargo, para los residuos de flonicamida y flubendiamida no fue posible estimar el tipo de respuesta funcional debido a que la densidad máxima ofrecida no fue suficiente para modelizar este parámetro.

Maus (2008) consideró al producto spirotetramat como un compuesto con un perfil ecotoxicológico favorable. Para *N. tenuis*, en el presente estudio, no hubo diferencias en el consumo respecto del control, aunque al

modelizar la respuesta funcional aumentó casi al doble el tiempo de manipulación (Th). Este incremento disminuye directamente el tiempo disponible para cada presa (tiempo total = tiempo de búsqueda + tiempo de manejo) y por tanto altera de forma directa la eficiencia del depredador en condiciones reales (Řezáč et al. 2010, Lucas y Rosenheim 2011, He et al. 2012). Esto puede deberse a una estrategia utilizada por el depredador en respuesta al estrés causado por el insecticida, el cual aumenta el esfuerzo necesario para la adquisición de alimento (Malaquias et al. 2014). Para las hembras de *N. tenuis*, deltametrina redujo el consumo respecto del testigo de forma significativa y la respuesta funcional mostró una tasa de ataque (a) muy inferior a la obtenida en el tratamiento de agua, lo que altera la habilidad del depredador como regulador de la población de la presa (Li et al. 2006).

Respecto al insecticida flonicamida, aunque produjo diferencias en el consumo respecto el control, no fue posible estimar su influencia en la respuesta funcional de *N. tenuis*, puesto que ningún modelo estimó los parámetros de tasa de ataque o tiempo de manipulación, lo que se atribuye a que las densidades utilizadas no fueron suficientes para establecer la asíntota. Sin embargo Joost (2006) y Morita et al. (2007) lo han caracterizado como un producto antialimentario en fitófagos con aparato bucal chupador. Por ejemplo, inhibe la ingestión del floema por el pulgón *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) en condiciones de laboratorio sobre hojas de pimiento (Koo et al. 2015).

La respuesta funcional puede cambiar de un tipo a otro por diferentes condiciones como estrés o cambios ambientales (Mohaghegh et al. 2000). Para el residuo de flubendiamida se observó un cambio en la respuesta funcional de tipo II en el tratamiento control, a tipo III. Este cambio indica

que la tasa de captura (a) en la presencia del residuo de flubendiamida sería baja cuando el número de presas ofrecidas fuese bajo y que se produciría una prolongación en el tiempo de manipulación (Th) (Li et al. 2006). Pereira (1982) observó un comportamiento similar cuando expuso hembras de *E. formosa* a residuos de la mezcla de las piretrinas permetrina y tetrametrina, sobre plantas de judía (*P. vulgaris*). En estudios más recientes, Valderrama et al. (2007) observaron diferencias en el tipo de respuesta funcional según la presa ofrecida a adultos de *N. tenuis*, siendo de tipo II sobre *T. vaporariorum* y de tipo III sobre ninfas de *M. persicae*. Además, en el estudio de Martinou et al. (2014) también se observó un efecto en la velocidad de alimentación pero no en la eficiencia del depredador (consumo) cuando adultos del mírido *M. pygmaeus* estuvieron expuestos vía residual (sustrato inerte) y cadena trófica (huevos de *E. kuehniella*) a la diamida chlorantraniliprole (ingrediente activo con el mismo modo de acción que flubendiamida). Tras estimar la respuesta funcional, se determinó que la exposición a esta diamida también influyó en el tiempo de manipulación de este mírido (Martinou y Stavrínides 2015).

Aunque no fue posible evaluar el efecto de sulfoxafloz en el consumo del depredador, el trabajo de Poletti et al. (2007) tiene interés, ya que estudiaron tres plaguicidas neonicotinoides (acetamiprid, imidacloprid y thiamethoxam) sobre hembras de los depredadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) y *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae), observando importantes cambios en los parámetros de la respuesta funcional, principalmente en el caso de imidacloprid, siendo más susceptible *P. macropilis*. Otro estudio de respuesta funcional que involucra a neonicotinoides es el de Řezáč et al. (2010), quienes no observaron ningún efecto en la tasa de ataque o tiempo de manipulación

de *Philodromus cespitum* (Walckenaer) (Aracnidae: Philodromidae) después de exponer adultos de este depredador al residuo de acetamiprid. Sin embargo, los residuos de otro neocotinoide (thiacloprid) inhibieron el consumo de huevos y afectaron al tiempo de descanso y de acicalamiento de *M. pygmaeus* expuestos a contaminación residual y oral al mismo tiempo (Martinou et al. 2014). Igualmente, He et al. (2012) observaron un aumento importante en el tiempo de manipulación cuando el depredador *S. japonicum* estuvo expuesto a diferentes densidades de huevos de la plaga *B. tabaci* sometidos a diferentes tipos de contaminación del neonicotinoide imidacloprid (residual sobre hojas de algodón y presa libre de insecticida o contaminación directa de la presa), sin que la tasa de ataque se viera afectada. En el mismo ensayo, la voracidad se vio reducida en un 41% cuando el depredador se expuso durante 24 h a las hojas de algodón con residuo del neonicotinoide. Este mismo producto, mostró propiedades antialimentarias en algunos hemípteros plaga (Nauen et al. 1998).

Capítulo VI. Toxicidad de modernos insecticidas por contacto residual sobre *Macrolophus basicornis*. Comparación de la metodología secuencial OILB en dos míridos depredadores

6.1. Introducción

Parte de este capítulo es el resultado de una estancia predoctoral de tres meses, realizada en el Laboratorio de Selectividad de la Universidad Federal de Lavras (UFLA) (Minas Gerais, Brasil) y cotutorada por el Dr. Geraldo Andrade Carvalho.

Actualmente en Brasil, la mayoría de los productores de tomate todavía utilizan la aplicación de insecticidas de amplio espectro como la principal táctica para el control de plagas (Oliveira et al. 2003, Bueno et al. 2013, Silva et al. 2016). En el caso de *T. absoluta* (principal plaga en América del Sur en el cultivo de tomate), se requiere una alta frecuencia de aplicaciones durante todo el ciclo de cultivo (Guedes y Picanco 2012, Bueno et al. 2013). Por ejemplo, hasta la semana 12 del ciclo de producción, el cultivo de tomate puede recibir entre 4 y 6 aplicaciones insecticidas contra *T. absoluta* y moscas blancas (Guedes y Picanco 2012). Esta constante aplicación de productos puede eliminar los enemigos naturales presentes en la zona y ha sido determinante en la evolución de la resistencia a los insecticidas (Siquera et al. 2000), la cual es una causa probable de fallos en el control de la plaga (Silva et al. 2016). Por tanto, es necesario buscar nuevas estrategias más efectivas y respetuosas con el medio ambiente en el control de ésta y de otras plagas.

¹Parte de los resultados presentes en este capítulo han sido publicados en: Wanumen, A.C., Carvalho, G.A., Medina, P., Viñuela, E., & Adán, Á. (2016). Residual Acute Toxicity of Some Modern Insecticides Toward Two Mirid Predators of Tomato Pests. *Journal of Economic Entomology*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tow059>.

Bueno et al. (2012, 2013) realizaron una búsqueda de depredadores nativos con un alto potencial en el control de *T. absoluta*. En su búsqueda encontraron tres especies de míridos prometedoras: *Campyloneuropsis infumatus* (Carvalho), *Engytatus varians* (Distant) (Hemiptera: Miridae) y *M. basicornis*. En concreto, *M. basicornis* se puede desarrollar y reproducir sobre planta de tomate y presenta una tasa de depredación de huevos y larvas de *T. absoluta* comparable a *N. tenuis* y otros míridos utilizados en Europa en el control de la plaga (Bueno et al. 2013).

Macrolophus basicornis ha sido citado en Argentina, Brasil, Cuba, Guatemala y Venezuela (Melo et al. 2004, Hernández y Henry 2010). Es capaz de caminar y buscar la presa de forma activa sobre las hojas de tomate (Montes 2013, Lins 2014), presenta una dieta zoofitofaga (Lins 2014) y es un depredador generalista. Su tasa de depredación en *T. absoluta* es de $100,9 \pm 3,4$ huevos en 24 h (Bueno et al. 2013, Lins 2014) y puede alimentarse de otras presas como los áfidos *Myzus persicae* (Sulzer) y *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) (Díaz et al. 2014), trips, moscas blancas, ácaros y otras plagas de lepidóteros (Bueno et al. 2013). El ciclo biológico del depredador comienza cuando las hembras ovipositan en el tejido vegetal de las plantas (con preferencia en la nervadura principal de las hojas y en el tallo), permaneciendo el huevo en el interior del tejido vegetal y solo siendo visible el opérculo (lígula). Estos huevos muestran una forma oval alargada (0,813 mm de longitud y 0,254 mm de largo) y una coloración blanca translúcida. El estado de ninfa presenta cinco estadios, los estadios N₁ y N₂ son totalmente ápteros. El desarrollo de los esbozos alares se inicia en el estadio N₃ y se desarrolla gradualmente hasta la aparición de las alas en estado adulto. El tiempo de

desarrollo total desde huevo hasta adulto es de $28,9 \pm 0,2$ días a una temperatura constante de 24 °C (Montes 2013).

Debido al uso potencial de *M. basicornis* en cultivos de tomate como agente de control biológico, es de interés conocer los efectos de insecticidas utilizados actualmente en dicho cultivo en Brasil. Como se ha dicho anteriormente, la OILB ha propuesto una metodología secuencial con el objetivo de identificar los productos fitosanitarios que respeten a los enemigos naturales y puedan ser usados en programas de MIP (Hassan 1987, 1994, Sterk et al. 1999). Aunque todavía no se dispone de datos de compatibilidad para *M. basicornis*, sí se dispone de listas de materias activas con los efectos letales y de persistencia para otras especies de míridos empleadas como agentes de control biológico en Europa (Agrobio 2016a, Koppert 2016a, OILB 2016b). Por ello, en este capítulo se ha planteado si la clasificación de toxicidad OILB de insecticidas (con el mismo modo de acción) (IRAC 2016) en agentes benéficos próximos filogenéticamente (*N. tenuis* y *M. basicornis*) resulta similar e intercambiable.

6.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Evaluar la toxicidad del residuo fresco de cinco insecticidas utilizados actualmente en el cultivo de tomate en Brasil (en condiciones de laboratorio y semicampo) sobre adultos del depredador *M. basicornis*.
- Realizar ensayos de persistencia de los insecticidas que resulten tóxicos para *M. basicornis*.
- Comparar la clasificación toxicológica de los insecticidas equivalentes en su modo de acción, de acuerdo a su efecto letal en *M. basicornis* y *N. tenuis*.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Material vegetal y su manejo

6.3.1.1. Plantas de tabaco

Se utilizaron plantas de tabaco *Nicandra physalodes* (L.) cultivar TNN, para todo el proceso de cría del depredador. La siembra se realizaba en bandejas de plástico (50 cm x 30 cm x 15 x cm) con abono orgánico como sustrato. En el momento que las plántulas mostraron dos pares de hojas verdaderas (BBCH 12), se trasplantaban a macetas de plástico con dos litros de capacidad, hasta alcanzar una altura aproximada de 25 cm.

6.3.1.2. Plantas de tomate

Para la realización de una parte de los ensayos se utilizaron plantas de tomate variedad Santa Clara. El semillado se realizó en semilleros de corcho blanco (60 alveolos) con abono orgánico como sustrato. Una vez se observó la emergencia de las plántulas (BBCH 09), se esperó hasta que alcanzaran una altura aproximada de 10 cm y en ese momento se separaron en dos grupos. Un grupo fue destinado para la evaluación de la descendencia del depredador, mientras que el segundo grupo fue trasplantado a macetas de plástico de dos litros de capacidad hasta que las plantas de tomate alcanzaron una altura aproximada de 50 cm.

Durante todo este periodo, las plantas de tabaco y de tomate se mantuvieron en un invernadero con condiciones ambientales controladas (25 ± 4 °C, $40 \pm 5\%$ RH y fotoperiodo natural, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y riego manual cada dos días.

6.3.2. *Macrolophus basicornis*

Los adultos de *M. basicornis* se obtuvieron de la cría mantenida en el laboratorio del grupo de Control Biológico del Departamento de Entomología de la UFLA (Dirigido por la Dra. Vanda Bueno). La cría había iniciado con adultos recolectados en cultivos comerciales de tabaco cercanos a Ribeirão Vermelho (21° 08,596 S y 045° 03,466' W, 808 m altitud) en Lavras (Minas Gerais, Brasil).

Los individuos capturados se liberaban en cajas de metacrilato (60 cm de largo x 30 cm de ancho x 30 cm de profundidad). Estas cajas tenían dos aberturas circulares en sus laterales para facilitar el manejo de los

individuos y una puerta que cerraba herméticamente. En su interior se colocaba una planta de tabaco de 25 cm, cuya función era suministrar líquido y servir como sustrato de oviposición al depredador (**Figura 35**). Las plantas y los adultos permanecían en estas condiciones durante 7 días. Pasado este tiempo, las plantas con la puesta del mírido se retiraban a nuevas cajas esperando la siguiente generación del depredador. Una vez se observaban las ninfas sobre la planta de tabaco, se alimentaron dos veces por semana con huevos frescos de *E. kuehniella* (provenientes de Insecta Agentes Biológicos, Lavras, MG, Brazil), esparcidos sobre las hojas de la planta.

Toda la cría permaneció en un cuarto de condiciones controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ HR y fotoperiodo natural de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad).

Figura 35 Cría de *Macrolophus basicornis*. a) Caja de metacrilato, planta de tabaco y huevos frescos de *Ephestia kuehniella*. b) Adultos del depredador sobre la parte apical de la planta de tabaco.

La captura de los adultos para los ensayos (< 72 h desde la emergencia) se realizaba con un aspirador automático (Fanem Ltda.) que terminaba en frascos de metacrilato transparentes (2,5 cm de diámetro y 10 cm de altura), los cuales servían para transportar a los individuos hasta el lugar del ensayo (**Figura 36**).

Figura 36 a) Captura de adultos de *Macrolophus basicornis* por medio de un aspirador automático. b) Adultos del depredador dentro del frasco para su transporte al lugar de los ensayos.

6.3.3. Insecticidas evaluados

El modo de acción, producto comercial y demás características de los insecticidas utilizados se encuentran descritos en la sección 1.4. (**Tabla 2**).

6.3.4. Contaminación vía residual

En la realización de los ensayos se intentó en la medida de lo posible seguir la metodología empleada en los ensayos realizados en España sobre *N. tenuis*, de acuerdo con las recomendaciones de la OILB.

6.3.4.1. Exposición de adultos a residuo fresco sobre sustrato inerte

Para la aplicación de los insecticidas, se utilizó la Torre de Potter® (**Figura 37**). En este caso, la aplicación del producto se realizó en una cámara con ventilación y una fuente de agua exclusiva para la preparación de los compuestos antes de pulverizarlos sobre las placas de vidrio.

Figura 37 Torre de Potter®.

Se emplearon placas de vidrio cuadradas (12 cm² de área x 0,5 cm de grosor) tratadas en una sola cara. Una vez secas, las dos placas se unieron mediante un cuadrado de aluminio libre de insecticida (12 cm x 12 cm² x 2,5 cm de altura) de forma que los residuos quedaron en las superficies internas de la caja tratada. La unidad experimental se mantuvo sujeta

entre sí por seis gomas elásticas y se suministraron huevos frescos de *E. kuehniella* sobre la base recortada de vasos de plástico (3 cm de diámetro) y como bebedero se utilizó un trozo de judía verde fresca y se ubicaron de forma opuesta para que los adultos se vieran obligados a caminar sobre la superficie tratada (**Figura 38a**). La ventilación interna de cada caja se mantuvo por medio de seis agujeros cubiertos con visillo que estaban ubicados en tres de los lados del cuadrado. El cuarto lateral tenía una abertura (1 cm de alto x 2 cm de largo) que facilitó la introducción de los 15 adultos a la unidad experimental, puesto que podía abrirse y cerrarse fácilmente (**Figura 38b**). En este ensayo no fue posible utilizar ventilación forzada.

Figura 38 Contaminación residual sobre sustrato inerte. a) Detalle de la unidad experimental de contaminación residual sobre sustrato inerte. b) Distribución de unidades experimentales en el lugar del ensayo.

Se introdujeron 15 adultos de edad uniforme (< 72 h desde la emergencia) por unidad experimental y se utilizaron 5 replicas por tratamiento. El efecto letal se evaluó diariamente durante el periodo de exposición a los residuos (72 h).

Al evaluar el efecto subletal en la reproducción (numero de ninfas por hembra y día), los adultos supervivientes de cada tratamiento se sexaron bajo lupa binocular y se formaron doce parejas (repeticiones) por tratamiento. Debido a las dificultades que surgieron en la evaluación de este parámetro se repitió el ensayo tres veces cambiando el sustrato para la oviposición. En un primer ensayo se utilizaron cilindros circulares de PVC (15 cm de diámetro x 7 cm de altura), cuya base y tapa fueron telas de visillo sujetas con gomas elásticas (**Figura 39a**). En su interior se colocó el alimento (huevos frescos de *E. kuehniella*) y como sustrato de oviposición y fuente de líquido, una vaina completa de judía verde (**Figura 39b**). La pareja permaneció durante seis días en condiciones controladas, con cambios de judía cada dos días. Once días después de retirada la pareja se contó el número de ninfas emergidas en la judía.

Figura 39 Unidad experimental empleada para evaluar el efecto en la reproducción (número de ninfas emergidas por hembra y día en el ensayo 1. a) Interior de la unidad experimental, sustrato de oviposición. b) Enidad experimental en el lugar del ensayo

En un segundo ensayo se utilizó como sustrato de oviposición una planta de tomate (10 cm) que se colocó dentro dentro de un vaso plástico (16 cm

de altura x 12 cm de diámetro), con una tapa de visillo sujeta con una goma elástica para permitir la ventilación de la unidad experimental y un comedero de huevos frescos de la presa (**Figura 40**).

Figura 40 Unidad experimental para evaluar el efecto en la reproducción del depredador (ensayo 2).

La preparación de las plántulas de tomate consistió en sembrar y mantener en condiciones de invernadero hasta que alcanzaron la altura deseada (10 cm) utilizando como sustrato abono orgánico (**Figura 41a**). En ese momento, la raíz se cubrió con algodón blanco (**Figura 41b**) y se trasplantó a un vaso (3 cm de diámetro), separando la parte radicular con una película de plástico transparente dejando en el exterior la parte vegetativa de la plántula (**Figura 41c**). Finalmente, el algodón se humedeció y se colocó una base de vidrio para almacenar el exceso de agua (**Figura 41d**).

Figura 41 Preparación material vegetal para ensayo 2 de efecto en la reproducción de *Macrolophus basicornis*. a) Plántula de tomate con 10 cm de altura en sustrato de tierra. b) Parte radicular cubierta por algodón para mantener la humedad durante seis días. c) Plántula con algodón y película transparente que separa la parte aérea de la radicular. d) Plántula hidratadas y listas para el montaje del ensayo.

Para contar el número de ninfas emergidas en cada unidad experimental, el tallo se sacudió sobre una superficie de color negro utilizando un pincel fino (**Figura 42**).

Figura 42 Metodología empleada para contar el número de ninfas emergidas por unidad experimental (ensayo 2).

Finalmente en el tercer ensayo, se utilizó como sustrato de oviposición el mismo material de la cría general (plántulas de tabaco). El semillado fue igual al descrito en la sección 6.3.1.2. Se realizó un único trasplante a los mismos vasos plásticos utilizados anteriormente con las plántulas de tomate (**Figura 43a**). Debido a que las plántulas de tabaco ofrecían a las ninfas emergentes hojas más grandes y a que se llenó por completo el vaso de plástico con el sustrato (evitando que las ninfas se perdieran entre las raíces como podría ocurrir en el ensayo con plántulas de tomate), en este caso no fue necesario cubrir el sustrato con algodón blanco, ni separar la parte vegetativa de la radicular (**Figura 43b**). Como unidad experimental, se utilizó una plántula de tabaco, una pareja del depredador y un comedero de huevos frescos de la presa, dentro de la misma caja plástica con la ventilación descrita anteriormente (**Figura 43c**).

Figura 43 Preparación del material vegetal para ensayo 3 de efecto en la descendencia de *Macrolophus basicornis*. a) Proceso de trasplante de las plántulas de tabaco a sustrato de tierra. b) Plántula de tabaco trasplantada + una pareja del depredador. c) Unidad experimental utilizada.

6.3.4.2. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal.

Evaluación de la persistencia

La aplicación de los productos sobre las plantas de tomate fue igual que la descrita en el ensayo de contaminación residual para el depredador *N. tenuis* (sección 4.3.3.1.); sin embargo, las unidades experimentales fueron diferentes. En este caso, se utilizó una Placa Petri de vidrio (15 cm de diámetro y 2 cm de altura) cuyo interior tenía un comedero de huevos frescos de *E. kuehniella* y la hoja de tomate tratada (últimos tres folíolos) con el pedúnculo dentro de un eppendorf (previamente relleno con agar

nutritivo al 3%); se liberaron 15 adultos de edad uniforme y se emplearon cinco replicas por tratamiento (**Figura 44**).

Figura 44 Unidad experimental en el ensayo de persistencia utilizando condiciones de laboratorio extendido.

Los residuos evaluados estaban dentro de los intervalos propuestos por la OILB: 0, 4, 11, 24 y 31 DDT. En cada uno de los residuos, se evaluó la mortalidad (efecto letal) a las 24 h (efecto de choque) y a las 72 h (mortalidad acumulada) de exposición de los insecticidas. La degradación de los productos se realizó en un invernadero con condiciones semicontroladas de $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $40 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo natural de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

6.3.4.3. Exposición de adultos a residuo fresco sobre planta de tomate

Las plantas de tomate se mantuvieron en condiciones controladas de invernadero ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$, $40 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo natural de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) desde el momento de la siembra hasta que alcanzaron una altura cercana a los 50 cm. En este momento se trataron

hasta el punto de goteo con un pulverizador manual. Se pulverizaron cuatro plantas (repeticiones) por cada insecticida. Una vez seco el residuo sobre la superficie vegetal, se colocó en la base de la planta un comedero de *E. kuehniella* y se cubrió con una jaula entomológica que consistía en una estructura de metal (30 cm de diámetro) con una cubierta de visillo. La parte basal de la jaula se cubrió con arena para evitar la fuga de los insectos (**Figura 45a**). Finalmente, se liberaron 30 adultos del depredador por unidad experimental. Dentro del invernadero las unidades experimentales se distribuyeron de forma aleatoria (**Figura 45b**).

Figura 45 a) Unidad experimental en el ensayo de semicampo, la cual consiste en una planta de tomate dentro de una estructura metálica circular cubierta con visillo, un comedero de huevos frescos de *Ephesia kuehniella*, 30 adultos del depredador y arena. b) Distribución completamente aleatoria de las unidades experimentales en el interior del invernadero.

6.4. Resultados

Al igual que en el caso de *N. tenuis*, para este mirido también zoofitofago se decidió evaluar el residuo fresco de todos los insecticidas en las tres etapas secuenciales de la metodología normalizada de la OILB: laboratorio, laboratorio extendido y semicampo, independientemente de los resultados obtenidos con el fin de profundizar en la la doble exposición (contacto e ingestión) que puede darse sobre planta tratada en comparación con el sustrato inerte.

6.4.1. Exposición de adultos a residuo fresco sobre sustrato inerte

En la **Figura 46** se muestra la mortalidad a las 24, 48 y 72 h después de iniciar el tratamiento. La mortalidad acumulada (72 h) en los tratamientos de flubendiamida y spiromesifén fue igual o inferior al testigo ($20,1\% \pm 7,3$) y solo los tratamientos de deltametrina, imidacloprid e indoxacarb presentaron un incremento importante en la mortalidad del depredador ($F = 18,15$; $df = 5, 29$; $P < 0,0001$). En las primeras 24 horas de exposición deltametrina ($58,5\% \pm 21,4$) e imidacloprid ($36,7\% \pm 8,8$) tuvieron un efecto de choque ($H = 16,96$; $P = 0,005$).

Figura 46 Mortalidad de adultos de *Macrolophus basicornis* tras la exposición durante 24, 48 y 72 h a residuos frescos sobre sustrato inerte en condiciones de laboratorio. Los valores $\pm$ ES son la media de cinco repeticiones (N = 15). Las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 24 h (mayúsculas) o 72 h (minúsculas) de exposición, con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

El efecto en la reproducción solo se evaluó en los tratamientos de flubendiamida y spiromesifén (tasa de supervivencia mayor del 50%). Sin embargo, a pesar de la realización de tres ensayos variando el sustrato de oviposición, no fue posible obtener resultados satisfactorios. En el primer ensayo, las vainas de judías verdes de las que se pudo disponer tenían una calidad muy baja, ya que no fue posible encontrarlas frescas y turgentes. Durante el tiempo total de evaluación (13 días) a las condiciones previamente indicadas, en la mayoría de las unidades experimentales se secaron (**Figura 47**) o se formaron hongos.

Figura 47 Detalle de judía verde fresca (sustrato de oviposición de adultos de *Macrolophus basicornis* expuestos a residuos de insecticida) después de 13 días en condiciones controladas de laboratorio.

El número de ninfas por hembra y día obtenido en el segundo ensayo (planta de tomate como sustrato) fue muy baja, tanto en el control ($1,0 \pm 0,1$) como en los tratamientos (flubendiamida y spirotetramat, $0,5 \pm 0,1$). Este comportamiento se puede atribuir al cambio drástico de sustrato de oviposición, ya que toda la cría se mantenía sobre plantas de tabaco y fue ésta la primera vez que se alimentaron y ovipositaron en planta de tomate. Por esta razón se escogió como sustrato de oviposición planta de tabaco en el siguiente ensayo.

En el tercer ensayo con plántula de tabaco, hubo problemas en el desarrollo de tejido vegetal (**Figura 48**). Se comprobó finalmente que el sustrato (abono orgánico) estaba contaminado. En este momento, debido a que la estancia en el laboratorio tenía un tiempo limitado, se decidió continuar la secuencia de ensayos de laboratorio extendido y semicampo, evaluando únicamente el efecto letal.

Figura 48 Detalle de plántula de tabaco (sustrato de oviposición de adultos de *Macrolophus basicornis* expuestos a residuos de insecticida) después de seis días en condiciones controladas de laboratorio.

6.4.2. Exposición de adultos a residuos sobre sustrato vegetal. Evaluación de la persistencia.

En la **Tabla 17** se muestran los resultados de mortalidad obtenidos tras la exposición del depredador al residuo fresco (0 DDT) en hoja de tomate. El único producto clasificado como inocuo fue flubendiamida. A las 24 horas de exposición fue evidente el efecto de choque causado por los residuos de deltametrina e imidacloprid ($F = 33,12$; $df = 5, 29$; $P < 0,001$). A las 72 h de exposición, se observaron mortalidades estadísticamente distintas al control y superiores al 50% en los tratamientos de deltametrina, imidacloprid, indoxacarb y spiromesifén ($F = 53,99$; $df = 5, 29$; $P < 0,001$). Por esta razón, se continuó con la evaluación de persistencia de estos productos (**Figura 49**).

Tabla 17 Mortalidad de los adultos de *Macrolophus basicornis* tras estar expuestos a hojas de tomate con residuo fresco de diferentes insecticidas tras 24 h y 72 h de contacto residual.

Compuesto	Concentración (mg i.a./l)	24 h	72 h
Testigo	-	6,7 ± 2,9 a	20,1 ± 4,6 a
Deltametrina	12,5	65,3 ± 2,5 c	93,3 ± 3,6 d
Flubendiamida	240	11,9 ± 2,3 a	26,8 ± 5,2 a
Imidacloprid	100	85,3 ± 2,5 c	100,0 ± 0,0 d
Indoxacarb	48	11,5 ± 4,8 a	73,9 ± 2,4 c
Spiromesifén	240	33,3 ± 8,7 b	57,3 ± 7,5 b

Los valores son la media de cinco repeticiones (N = 15). Para cada tiempo de exposición, las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas, con un nivel de significación de $P \leq 0,05$.

En la **Figura 49** se muestran los resultados de mortalidad corregida para los distintos residuos y tratamientos. Deltametrina (23,1% ± 5,2) y spiromesifén (0%) perdieron su toxicidad para el residuo de 4 DDT (testigo: 2,7% ± 1,6), por lo que se clasificaron como productos de vida corta (clasificación OILB A). Indoxacarb perdió su toxicidad gradualmente hasta llegar a ser un producto inocuo en el residuo de 11 DDT (testigo: 5,3% ± 3,9) y por tanto se clasificó como ligeramente persistente (clasificación OILB B). Finalmente, el único producto considerado persistente (clasificación OILB D) fue imidacloprid, ya que solo perdió su toxicidad a los 31 DDT (testigo: 1,3% ± 1,3).

Figura 49 Efecto de diferentes insecticidas (residuos de 0, 4, 11, 24 y 31 DDT) en la mortalidad de adultos de *Macrolophus basicornis* tras 24 h (oscuro) y 72 h (claro) de exposición sobre hojas de tomate en condiciones de laboratorio extendido. Las barras representan la media $\pm$ ES de cinco repeticiones (N = 15).

6.4.3. Exposición de adultos a residuo fresco sobre planta de tomate

Cuando se utilizaron las condiciones de semicampo, la mortalidad de los depredadores fue muy similar entre el tratamiento control y todos los insecticidas evaluados, excepto deltametrina e imidacloprid los cuales alcanzaron mortalidades del $70,0\% \pm 13,5$ y $95,0\% \pm 3,8$, respectivamente ($F = 16,63$; $df = 5, 23$; $P < 0,0001$) (**Figura 50**).

Figura 50 Mortalidad de adultos de *Macrolophus basicornis*, tras la exposición a residuos frescos sobre planta de tomate en condiciones de semicampo al cabo de 72 h. Los valores son la media $\pm$ ES de cuatro repeticiones ($N = 30$). Las medias por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 72 h de exposición, con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

A pesar de las condiciones de menor exposición para los adultos del depredador en este ensayo, el efecto letal de imidacloprid fue más elevado que el obtenido en sustrato inerte, mientras que el producido por deltametrina no se redujo.

6.4.4. Comparación de la clasificación de los insecticidas para *N. tenuis* y *M. basicornis*

En la **Tabla 18** se muestra la clasificación de los insecticidas evaluados de acuerdo con el efecto letal que tuvieron en los dos depredadores expuestos a residuo fresco. Deltametrina (aplicada a la misma dosis) solo se clasificó con la misma categoría, ligeramente tóxico, cuando se utilizó sustrato inerte (vidrio) aunque la mortalidad registrada en esta fase fue muy superior para *M. basicornis* ($74,6\% \pm 14,8$) que en *N. tenuis* ($45,3\% \pm 7,1$). Sobre sustrato vegetal, la susceptibilidad de *M. basicornis* fue notoriamente mayor, ya que alcanzó categorías de 4 y 3 en los residuos sobre hoja y planta de tomate respectivamente, mientras que para *N. tenuis* se mantuvo la categoría OILB 2.

Flubendiamida fue siempre un producto inocuo para ambos miridos, a pesar de que la concentración ensayada en Brasil fue mucho mayor que en España. Spirotetramat y spiromesifén compartieron la categoría 1 en laboratorio (sustrato inerte) y semicampo, aunque en laboratorio en hoja de tomate spiromesifén fue categoría 2. Por tanto, ambos productos fueron clasificados como productos con bajo nivel toxicológico (categoría OILB 1 o 2) en todos los pasos de la metodología secuencial.

Los residuos de los insecticidas metaflumizona e indoxacarb no fueron incluidos en la misma categoría toxicológica en ningún paso secuencial; sin embargo, sí obtuvieron clasificaciones próximas y mostraron la misma tendencia de pérdida de toxicidad en las condiciones de semicampo. Finalmente, los insecticidas dentro del grupo IRAC 4, fueron clasificados como tóxicos (clasificación OILB 4) en todas los pasos secuenciales, excepto en sustrato inerte (laboratorio), donde imidacloprid fue clasificado como ligeramente tóxico (clasificación OILB 2).

Tabla 18 Comparación de las categorías OILB de clasificación toxicológica respecto al efecto letal producido por la exposición a residuo fresco de insecticidas dentro del mismo grupo IRAC (modo de acción) entre *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus basicornis*.

Grupo MoA de los insecticidas ¹	Concentración (mg i.a./l)	Laboratorio ²		Laboratorio extendido ³		Semicampo ³	
		Sustrato inerte		Hoja de tomate		Planta de tomate	
		<i>N. tenuis</i>	<i>M. basicornis</i>	<i>N. tenuis</i>	<i>M. basicornis</i>	<i>N. tenuis</i>	<i>M. basicornis</i>
3 (Deltametrina)	12,5	2	2	2*	4	2	3
28 (Flubendiamida)	60/240	1	1	1	1	1	1
23 (Spirotetramat/Spiromesifén)	75/240	1	1	1	2	1	1
22 (Metaflumizona/Indoxacarb)	240/48	2	3	4	3	2	1
4 (Sulfoxaflor/Imidacloprid)	60/100	4	2	4	4	4	4

¹Clasificación IRAC (modo de acción) = 3: modulador del canal de sodio; 28: modulador del receptor de rianodina; 23: inhibidores de la acetil CoA carboxilasa; 22: bloqueador del canal de sodio dependiente de voltaje; 4: agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR). ²Categorías de toxicidad según la OILB: 1, inocuo (<30 %); 2, ligeramente tóxico 30-79 %; 3, moderadamente tóxico (80-99 %); 4, tóxico (>99 %). ³Categorías de toxicidad según la OILB: 1, inocuo (< 25 %); 2, ligeramente tóxico (25-50 %); 3, moderadamente tóxico (51-75 %) y 4, tóxico (> 75 %). *No se obtuvieron diferencias significativas respecto al control

Respecto a la evaluación de la persistencia (**Tabla 19**), flubendiamida fue el único producto no evaluado por resultar inocuo a los 0 DDT (no persistente). Deltametrina (grupo IRAC 3) se clasificó como un producto de vida corta (categoría OILB A), tanto en España como en Brasil; spiromesifén (grupo IRAC 23) se clasificó en la misma categoría, tras perder la toxicidad a los 4 DDT. En el grupo 22 IRAC, indoxacarb se consideró inocuo a los 11 DDT y por tanto se catalogó como un producto ligeramente persistente (categoría OILB B) para los adultos de *M. basicornis*; aunque metaflumizona perdió gradualmente su toxicidad, nunca se clasificó como inocuo y por tanto se consideró como un producto persistente (categoría OILB D). Finalmente, ambos insecticidas incluidos en el grupo IRAC 4 fueron productos persistentes (categoría OILB D), ya que imidacloprid sólo perdió su toxicidad en el residuo de más de 30 DDT, mientras que sulfoxaflor aún lo mantuvo en esta etapa.

Tabla 19 Comparación de la clasificación de categorías OILB de persistencia de diferentes insecticidas que comparten el mismo grupo IRAC (modo de acción) tras exponer a *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus basicornis* a diferentes residuos degradados de estos compuestos.

Grupo MoA de los insecticidas ¹	Concentración (mg i.a./l)	Especie de mío	Categoría de persistencia (Clasificación OILB) ²			
			A: < 5 DDT	B: 5-15 DDT	C: 16-30 DDT	D: > 30 DDT
			4 DDT ³	10-11 DDT	23-24 DDT	34-31 DDT
3 (Deltametrina)	12,5	<i>M. basicornis</i>	23,1 ± 5,4 (1)			
23 (Spiromesifén)	240	<i>M. basicornis</i>	0,0 ± 0,0 (1)	-	-	-
22 (Metaflumizona/Indoxacarb)	240	<i>N. tenuis</i>	64,8 ± 9,0 (3)	32,4 ± 8,5 (2)	29,6 ± 2,2 (2)	50,2 ± 10,3 (3)
	48	<i>M. basicornis</i>	30,6 ± 4,6 (2)	5,5 ± 3,4 (1)	-	-
4 (Sulfoxaflor/Imidacloprid)	60	<i>N. tenuis</i>	100 ± 0,0 (4)	100 ± 0,0 (4)	81,7 ± 7,9 (4)	66,9 ± 3,2 (3)
	100	<i>M. basicornis</i>	83,6 ± 8,8 (4)	71,9 ± 4,9 (3)	53,6 ± 10,3 (3)	7,6 ± 5,1 (1)

Los valores son la media de cinco repeticiones por tratamiento (N = 15). Entre paréntesis se encuentran las categorías de toxicidad según la OILB utilizadas en laboratorio extendido: 1, inocuo (< 25%), 2, ligeramente toxico (25-50%); 3, moderadamente toxico (51-75%) y 4, tóxico (>75%). ¹Clasificación IRAC (modo de acción) = 3: modulador del canal de sodio; 28: modulador del receptor de rianodina; 23: inhibidores de la acetil CoA carboxilasa; 22: bloqueador del canal de sodio dependiente de voltaje; 4: agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR). ²Clasificación de persistencia según la OILB: A: poco persistente; B: ligeramente persistente; C: moderadamente persistente y D: persistente. ³DDT: Días después del tratamiento.

6.5. Discusión

Los resultados presentados en este capítulo indican que flubendiamida es un producto que no tiene efecto letal residual en *M. basicornis* y *N. tenuis*, lo que está de acuerdo con su elevada especificidad contra especies de lepidópteros (Lahm et al. 2009). En las revisiones y ensayos que se han realizado con este insecticida tampoco se muestran efectos negativos de esta diamina en un amplio grupo de enemigos naturales, tanto parasitoides como depredadores (Tohnishi et al. 2005, Gentz et al. 2010, Sattar et al. 2011, Lefebvre et al. 2012, Medina et al. 2012 y Garzón et al. 2015). Dentro del orden Hemiptera, Carvajal et al. (2012) tampoco encontraron efectos negativos al contaminar vía tópica a los huevos y larvas de 1^{er} estadio del hemíptero, *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae), el principal vector de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

Por lo general, la máxima toxicidad se obtiene en sustrato inerte porque al no absorberse el producto, se ofrece la máxima exposición al residuo (Sterk et al 1999, van de Veire et al., 2002). Sin embargo, imidacloprid y spiromesifén fueron más tóxicos sobre sustrato vegetal que sobre sustrato inerte. Como ya se comentó en el capítulo IV, este resultado se puede atribuir al comportamiento de alimentación zoofitofago de *M. basicornis* (Lins 2014) y a la actividad sistémica o a la capacidad de atravesar la capa de ceras de la epidermis de los productos (MacBean 2012). Este resultado se puede observar también en otros depredadores con una fitofagia menos acusada que los míridos, pero que realizan también catas en los tejidos vegetales. Van de Veire et al. (2002), tras exponer a los adultos de *O. laevigatus* a residuo fresco de pimetrozina (bloqueador de alimentación), observaron una mortalidad del 25% en sustrato inerte y del 52% en las

hojas de crisantemo, lo que resulta en un cambio en la clasificación de inocuo (categoría OILB 1) sobre sustrato inerte, a moderadamente tóxico (categoría OILB 3) sobre sustrato vegetal.

Deltametrina fue el único formulado comercial que se evaluó en ambas especies de miridos con la misma concentración. Los resultados obtenidos fueron dispares en los dos depredadores, mostrando *M. basicornis* una mayor susceptibilidad. Solans e Izquierdo (1997) evaluaron el impacto causado por deltametrina en las ninfas N₃ de *D. tamanini* y *M. pygmaeus* por exposición residual (sustrato inerte y vegetal) y aplicación tópica. En ambos casos se mostró mayor sensibilidad sobre *M. pygmaeus*; en sustrato inerte, el piretroide causó una mortalidad del 35% en *D. Tamanini* y del 92,6% en *M. pygmaeus*. Sin embargo, en sustrato vegetal el producto fue inocuo para ambas especies. Respecto a su actividad residual, se clasificó como un producto no persistente, tanto en España como en Brasil, lo que se puede atribuir a la fácil fotodegradación de los piretroides (Lui et al. 2010).

En este trabajo, los insecticidas más perjudiciales para los depredadores *N. tenuis* y *M. basicornis* fueron los pertenecientes al grupo IRAC 4, sulfoxaflor perteneciente al subgrupo 4C (sulfoxaminas) e imidacloprid al 4A (neonicotinoides). Ambos insecticidas actúan como agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina y se utilizan principalmente para el control de insectos chupadores, aunque también pueden ser eficaces en otras plagas (Tomlin 2009, Babcock et al. 2011). Es importante resaltar que imidacloprid tiene una excelente actividad sistémica (Lowery y Smirle 2003) y es también un producto más activo por ingestión que por contacto (Adán et al. 2011). Esta alta toxicidad por parte de imidacloprid también se observó en los estudios de Delbeke et al. (1997) sobre adultos de *O.*

laevigatus después de la contaminación por cadena trófica y el contacto residual con este neocotinoide. La supervivencia de los adultos *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Geocoridae) y *O. insidiosus* también se vio afectada tras estar en contacto con superficies contaminadas con este insecticida (Prabhaker et al. 2011). Los mismos autores concluyeron que la toxicidad puede ser debido a la contaminación conjunta causada por la alimentación del tejido vegetal contaminado y por el contacto con la superficie tratada.

Sulfoxalfor e imidacloprid fueron además los productos más persistentes. van de Veire et al. (2002) encontraron una degradación del residuo de imidacloprid, pasando de causar el 100% de mortalidad a los 7 DDT al 65% a los 14 DDT (22-25 °C, 55-60%HR, fotoperiodo de 16:8 h). Preetha et al. (2008), mostraron una persistencia del producto hasta 31 DDT (según la concentración del producto) sobre *A. gossypii*. Sulfoxaflor fue un producto aún más residual. Se desconoce si se trata de una propiedad intrínseca al propio producto o a las diferentes condiciones ambientales a las que estuvieron expuestos los residuos, ya que en Brasil había más horas de luz y temperaturas más altas. En estudios similares, van de Veire et al. (2004) demostraron que los insecticidas spinosad y abamectina tuvieron mayor actividad residual sobre *E. formosa* en Bélgica y España que en Italia, debido a la intensidad de la luz que fue mayor en el experimento italiano.

Indoxacarb fue otro compuesto que difería en la toxicidad entre el sustrato inerte y el vegetal siendo mayor en el primero. Tillman et al. (2002) encontraron que tanto *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera: Miridae) como *G. punctipes* eran susceptibles a indoxacarb cuando caminaban sobre superficies tratadas y se alimentaban a través de residuos frescos en las plantas de algodón, sin tener mayor efecto por

contaminación directa. Sin embargo, la toxicidad por alimentación de tejido tratado se eliminó con la aplicación de agua a los 5 DDT y con un enjuague con detergente a los 0 DDT, de lo que se concluía que el insecticida se podía adherir a la cutícula cerosa de las hojas de algodón, pero se perdía por el lavado. Además, los resultados de mortalidad en el presente trabajo son consistentes con Sterk et al. (2003), tras obtener una mortalidad del 25% en *M. pygmaeus* después de su exposición a residuos de indoxacarb en plantas de tomate en condiciones de semicampo y con los resultados de Arnó y Gabarra (2011), que encontraron mortalidades del 77% y 47% de los adultos de *N. tenuis* y *M. pygmaeus*, después de la exposición a los residuos sobre hojas de tomate. van de Veire y Tirry (2003), también citan una importante tasa de mortalidad (52%) sobre ninfas del mírido *M. pygmaeus* tras estar en contacto con residuos frescos de indoxacarb (300 mg i.a./L) sobre hoja de pimiento dulce.

Los insecticidas indoxacarb y metaflumizona (grupo IRAC 22) no compartieron la misma categoría de toxicidad en las pruebas de laboratorio y semicampo. Esto puede ser porque metaflumizona es menos selectivo que indoxacarb y proporciona control para una gama más amplia de plagas, se aplica a una concentración mucho mayor, es más activo cuando se ingiere que por contacto y tiene propiedades translaminares moderadas (Tomlin 2009), por lo que un sustrato vegetal puede aumentar su acción sobre zoofitófagos. Esta menor selectividad, se ve claramente en las clasificaciones finales del residuo fresco para cada una de las especies evaluadas. El mismo comportamiento se registró en estudios realizados por Biondi et al. (2012), que encontraron en los adultos de *O. laevigatus* mayor susceptibilidad al residuo fresco de metaflumizona (80%) que al de indoxacarb (30%) en hojas de tomate contaminadas. Sin embargo, los estudios de Arnó y Gabarra (2011) indican mayor susceptibilidad a

indoxacarb sobre *N. tenuis* (mortalidad corregida de 75,7%), que sobre *M. pygmaeus* (mortalidad corregida de 46,8%) en contaminaciones con residuo fresco en hoja de tomate.

Cabe señalar que tanto indoxacarb como metaflumizona no causan mortalidad a las 24 horas, ya que necesitan activarse dentro del organismo (Tomlin 2009) y es posible, por tanto, que el periodo de evaluación del efecto letal, de 72 horas, resulte demasiado breve para este grupo concreto de insecticidas. Este comportamiento de “bioactivación” podría influir también en la evaluación de la persistencia de los dos productos.

Aunque no se han encontrado estudios sobre el impacto de spiromesifén en depredadores de la familia Míridae, se ha ampliado la búsqueda a insectos como *Monalonion velezangeli* Carvalho & Costa (Hemiptera: Miridae), plaga de los cultivos de aguacate, café y guayaba. Después de 72 h de exposición de ninfas y adultos del mío sobre plantas de guayaba tratadas, se obtuvo una mortalidad del 27,5% y por tanto fue clasificado como no útil para el control del fitófago (Montilla et al. 2014). Resultados observados en otros enemigos naturales también son consistentes con los obtenidos sobre *M. basicornis*. En ácaros depredadores, spiromesifén no produjo efectos letales sobre *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae) (Lefebvre et al. 2011). El mismo comportamiento fue observado por Bielza et al. (2009) con el parasitoide *E. mundus* y el depredador *O. laevigatus* cuando se expusieron a la misma formulación comercial (Oberon®) en condiciones de campo.

En resumen, en la exposición al residuo fresco, los insecticidas de los grupos IRAC 28 y 23, clasificados como inocuos (categoría OILB 1), y los del grupo 4, clasificados como tóxicos (categoría OILB 4), tuvieron

resultados comparables en ambas especies de depredadores. Los insecticidas de categorías intermedias en su clasificación final en semicampo, no coincidieron para los dos depredadores aunque fueron categorías consecutivas (ligera o moderadamente tóxicos). Deltametrina, único representante del grupo 3 fue más tóxico para *M. basicornis* que para *N. tenuis*. En el caso del grupo IRAC 22, metaflumizona afectó en mayor medida a los adultos de *N. tenuis* que indoxacarb a *M. basicornis*. En el esquema secuencial, las mayores discrepancias se obtuvieron en laboratorio y laboratorio extendido, mientras que en semicampo las categorías coincidieron o se acercaron.

Capítulo VII. Toxicidad de modernos insecticidas sobre *Nesidiocoris tenuis* tras su alimentación con presa contaminada¹

7.1. Introducción

Como se ha dicho anteriormente, existen diferentes rutas de contaminación o entrada de los plaguicidas en los enemigos naturales (Croft 1990, Ruberson et al. 1998). Una de ellas es la vía oral, que es aquella que se produce por la ingestión de sustancias contaminadas. Esta ingesta puede ser directa, por ejemplo en el caso de los míridos a través de la savia y jugos celulares de las plantas tratadas. Además, la ingesta del plaguicida puede ser indirecta cuando los productos tóxicos se mueven a través de los niveles tróficos (Croft 1990); en el caso de los depredadores, la ingestión de presa contaminada puede ser de gran importancia (He et al. 2012), pero, a pesar de ello, se trata de una ruta de contaminación poco estudiada.

En el caso de *N. tenuis*, esta ruta cobra mayor importancia al tener en cuenta que se trata de un depredador voraz, de gran eficiencia incluso frente a otros míridos (Mollá et al. 2014). Además es un enemigo natural generalista capaz de alimentarse de prácticamente todas las plagas presentes en el cultivo del tomate (Goula 1985, Urbaneja et al. 2005).

También es importante tener en cuenta en este tipo de estudios, que algunos plaguicidas presentan propiedades que afectan al consumo de presas. Pueden tener propiedades antialimentarias, o reducir la capacidad

¹Parte de los resultados de este capítulo se recogen en el artículo Wanumen, A.C., Sánchez-Ramos, I., Viñuela, E., & Adán, Á. (2016). Impact on mortality, offspring, longevity and surviving of feed contaminated prey on *Nesidiocoris tenuis* adults. En este momento ha superado la primera revisión en la revista *Journal of Insects Science* y está en periodo de cambios por parte de los autores.

olfativa, o afectar al sistema nervioso, lo que, en ambos casos, puede a su vez repercutir en la capacidad de búsqueda de sus presas (Desneux et al. 2007). Así mismo, pueden producir irritabilidad o repelencia, de forma que los insectos que entran en contacto con la fuente de contaminación se alejan de la misma (Mongkalangoon et al. 2009).

7.2. Objetivos

El presente trabajo se planteó para:

- En primer lugar, comprobar la ingestión de presa tratada con los insecticidas evaluados: deltametrina, flonicamida, flubendiamida, metaflumizona, spirotetramat y sulfoxaflor.
- Estimar el efecto letal que diferentes insecticidas modernos ejercen sobre las ninfas N₃ y los adultos del depredador *N. tenuis* al ingerir *ad libitum* presa tratada durante tres días.
- Evaluar los efectos subletales la supervivencia en el estado de ninfa, en la reproducción y en la longevidad en la etapa adulta después de finalizar el tratamiento.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. Evaluación preliminar del consumo de presa tratada

La finalidad de este ensayo fue asegurar que la contaminación vía presa tratada se producía durante los tres días de exposición y descartar posibles

propiedades de repelencia o de actividad antialimentaria de los insecticidas. Al comprobar la ingestión de presa contaminada, se descartó que los individuos murieran o estuvieran afectados por el ayuno.

Para el tratamiento de la presa, se utilizaron huevos de *E. kuehniella* en su presentación comercial (EPHEScontrol®) procedentes de la empresa Agrobio. Las diluciones de los productos se vertieron en placas de vidrio (7 cm de diámetro y 1,5 cm de altura). Posteriormente, sobre una tela de visillo se colocaron 0,05 g de huevos de *E. kuehniella* que se sumergieron durante 25 segundos en cada una de las soluciones insecticidas preparadas. En el tratamiento control, los huevos fueron sumergidos en agua destilada.

Trascurrido el tiempo de exposición, el visillo con los huevos tratados permaneció sobre papel absorbente a temperatura ambiente. Por medio de una lupa binocular (Leica® MZ6) se verificó que todos los huevos estuviesen cubiertos por el insecticida. Una vez seco el producto y con ayuda de una solución de goma de tragacanto al 3% (sustrato adhesivo), se pegaron uno a uno, en grupos de 50 huevos sobre una cartulina de plástico color negro (**Figura 51**).

Figura 51 Procedimiento para la contaminación de huevos de *Ephestia kuehniella* con insecticida en el ensayo preliminar (derecha) y bioensayo (izquierda). a) Preparación del material y momento en el cual se sumergen los huevos de la presa en el insecticida. b) Huevos sobre papel absorbente hasta que se seque el producto. c) Separación de cada una de las repeticiones por tratamiento; en el ensayo preliminar cartulinas plásticas negras con 50 huevos de la presa y en el bioensayo 5 grupos, cada uno con 0,2 g de huevos de la presa por tratamiento.

Cada unidad experimental consistió en una pareja de *N. tenuis*, que había estado previamente en ayuno de presa durante 24 horas. Como fuente de líquido se utilizó un trozo de judía verde fresca (2 cm) con los extremos cubiertos con parafina y como fuente de proteína un lote de 50 huevos de la presa expuesto previamente al insecticida. Todo se ubicó dentro de cajas de plástico (12 cm de diámetro x 5 cm altura), con un orificio cubierto con visillo (5,5 cm de diámetro) en la tapa para la ventilación interna de la unidad experimental. Durante 72 h, diez repeticiones por tratamiento se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio. El lote de huevos tratados fue reemplazado cada día por uno nuevo (que estuvo en las mismas condiciones que las unidades experimentales), durante un total de tres días. Se evaluó diariamente el porcentaje de consumo, teniendo en cuenta el número de huevos consumidos respecto al número de huevos ofrecidos (50 huevos).

7.3.2. Evaluación de los efectos de los insecticidas vía presa tratada

El tratamiento de los huevos de *E. kuehniella* se realizó como se ha descrito en el apartado anterior, pero en esta ocasión se contaminó 1 g de huevos por tratamiento [distribuidos en 5 grupos de 0,2 g (200 huevos aproximadamente), uno por repetición]. Cada grupo permaneció sumergido en el tratamiento durante un minuto. En el caso que los huevos flotaran, se empleó una barrilla de cristal para sumergirlos cuidadosamente en el producto. Tras tres horas a temperatura ambiente, cada grupo de 0,2 g se introdujo en comederos circulares (1 cm de diámetro). Las unidades experimentales se han descrito anteriormente (sección 7.3.1); se hicieron cinco replicas por tratamiento, cada una con 15

ninfas N₃ (< 24 h después de la muda) o 15 adultos de edad uniforme (< 72 h después de la emergencia) del depredador.

7.3.2.1. Efecto letal

Como efecto letal, se registró el efecto de choque (mortalidad a las 24 h de exposición) y la mortalidad acumulada durante 72 h de alimentación con la presa tratada, momento en el cual se sustituyó la dieta de presa tratada por presa sin tratar. Los individuos que no reaccionaron después de ser tocados varias veces por un pincel fino se consideraron muertos. En total se utilizaron cinco repeticiones por estado de desarrollo e insecticida, para un total de 75 individuos por tratamiento.

7.3.2.2. Evaluación indirecta del consumo

Con el fin de estimar el consumo realizado por las ninfas N₃ y adultos del depredador, los comederos y huevos ofrecidos se pesaron al inicio y al final del ensayo. Además, se tuvo en cuenta el efecto de desecación de los huevos en las condiciones del insectario, con un control negativo que no se expuso al consumo.

7.3.2.3. Efecto en la supervivencia de ninfas

En el caso de las ninfas N₃ alimentadas con huevos contaminados, se evaluó el efecto de los insecticidas en el desarrollo de la ninfa (desde N₃) hasta alcanzar el estado de adulto. Para ello se registró diariamente el número de ninfas muertas hasta que todos los individuos llegaron al estado adulto.

7.3.2.4. Efecto en la reproducción

El efecto de los insecticidas por vía trófica en la reproducción se evaluó siguiendo la metodología descrita anteriormente para la contaminación residual (sección 4.3.2.3).

7.3.2.5. Efecto en la longevidad

La longevidad en la etapa adulta de los individuos supervivientes a la contaminación vía trófica se estudió en las cajas de plástico descritas en la sección 7.3.1. Como fuente de líquido se utilizó un trozo de judía verde sellada en los extremos con parafina, pero en este caso el suministro de proteína se realizó con huevos de *E. kuehniella* libres de insecticida. En el caso de las ninfas N₃, se consideró como primer día de evaluación el día en que llegaron a adulto, mientras que en el ensayo con adultos, fue el momento en que se retiró la fuente de contaminación (72 h). Se registró diariamente la mortalidad de los adultos hasta que no hubo ningún superviviente.

7.4. Resultados

7.4.1. Evaluación preliminar del consumo de presa tratada

El consumo de huevos tratados con diferentes compuestos a las 24 h ($H = 7,51$; $P = 0,2758$) y 72 h ($H = 11,74$; $P = 0,0684$) no difirió significativamente con respecto al testigo. Aunque a las 48 h se obtuvo un valor de $P < 0,05$ ($H = 13,60$; $P = 0,0344$), el test de Dunn para la comparación de las medias no reveló diferencias significativas. Por tanto, no se observó efecto repelente, ni antiapetitivo durante el tiempo de exposición en ninguno de los

insecticidas evaluados. El consumo de presa tratada fue siempre superior al 75 % (**Tabla 20**).

Tabla 20 Huevos de *Ephestia kuehniella* (contaminados) consumidos por adultos de *Nesidiocoris tenuis*.

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Consumo (%)		
		24 h	48 h	72 h
Testigo	-	99,4 ± 0,6 a	96,8 ± 1,7 a	95,8 ± 1,4 a
Deltametrina	12,5	96,8 ± 1,9 a	99,2 ± 0,6 a	88,0 ± 7,4 a
Flonicamida	60	97,1 ± 2,1 a	98,0 ± 1,6 a	90,7 ± 6,4 a
Flubendiamida	60	95,4 ± 4,6 a	96,0 ± 3,6 a	98,2 ± 1,3 a
Metaflumizona	240	96,2 ± 2,5 a	90,2 ± 8,9 a	77,0 ± 14,1 a
Spirotetramat	75	89,0 ± 5,1 a	82,4 ± 7,2 a	83,3 ± 11,0 a
Sulfoxaflor	60	89,8 ± 9,7 a	76,0 ± 10,4 a	85,7 ± 3,3 a

Las medias de cada tratamiento corresponden a 10 repeticiones, cada una con una pareja (N = 1 hembra y 1 macho) del depredador. En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

7.4.2. Evaluación de los efectos de los insecticidas vía presa tratada

En el caso de los adultos, se presentan los resultados de dos ensayos separados en el tiempo, debido a que fue el estado de desarrollo más susceptible comparado con las ninfas N₃ y a que la evaluación de los insecticidas no se continuó en hoja (laboratorio extendido) o en planta (semicampo).

7.4.2.1. Efecto letal

Al analizar estos resultados con un test ANOVA de dos vías, no se detecta que el factor estado de desarrollo (*E*) influya en la mortalidad de los individuos. Sin embargo, el factor tipo de insecticida (*I*) y su interacción con el estado de desarrollo (*I* × *E*) sí fueron estadísticamente significativos (**Tabla 21**).

Tabla 21 Estadísticos de ANOVA de dos vías para la mortalidad acumulada observada en ninfa N₃ o en adulto de *Nesidiocoris tenuis*, tras alimentarse con presa contaminada por diferentes insecticidas durante 72 h.

Factor	Df	F	P
Estado de desarrollo (<i>E</i>)	1, 916	0,006	0,936
Insecticida (<i>I</i>)	6, 916	6,255	< 0,001
Estado × Insecticida (<i>I</i> × <i>E</i>)	6, 916	4,788	< 0,001

En la **Figura 52** se muestra el efecto en la mortalidad de *N. tenuis* cuando fueron contaminados vía cadena trófica con huevos de *E. kuehniella*. En el estado de ninfa no se observó efecto de choque ($F = 0,59$; $df = 6, 34$; $P = 0,7335$) ni efecto en la mortalidad acumulada ($F = 1,10$; $df = 6, 34$; $P = 0,3844$). En los adultos solo se observaron diferencias estadísticas entre el tratamiento de sulfoxaflor ($5,3\% \pm 1,7$) con respecto al control ($0,0\%$) ($F = 2,41$; $df = 6, 63$; $P = 0,0366$); la mortalidad acumulada producida por los tratamientos de metaflumizona y sulfoxaflor se incrementó alcanzando valores de $28,0\% \pm 7,3$ y $36,0\% \pm 6,4$ respectivamente ($H = 42,73$; $P < 0,0001$).

Figura 52 Mortalidad de ninfas (a) y adultos (b) de *Nesidiocoris tenuis* tras ser alimentados durante 24 y 72 h con huevos de *E. kuehniella* contaminados. Los valores representan 5 repeticiones en ninfa y 10 en adulto (N = 15). Las medias $\pm$ ES por tratamiento seguidas por la misma letra no son diferentes entre ellas a las 24 h (mayúsculas) o 72 h (minúsculas) de exposición, con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

7.4.2.2. Efectos subletales

7.4.2.2.1. Evaluación indirecta del consumo

Según la reducción en el peso de los huevos (antes y después del ensayo), una vez introducido el factor de corrección de pérdida de peso por desecación, hubo consumo en todos los tratamientos pero sin diferencias estadísticas con el control de agua, tanto en ninfas ($H= 8,226$; $P= 0,222$), o en adultos ($H= 6,2471$; $P= 0,3961$) (**Tabla 22**).

Tabla 22 Estimación del consumo (%) de los individuos alimentados con presa tratada durante 72 h.

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Ninfas	Adultos
Testigo	-	48,2 ± 1,8 ab	45,0 ± 14,8 a
Deltametrina	12,5	61,6 ± 5,3 a	31,4 ± 3,6 a
Flonicamida	60	44,6 ± 4,6 b	41,5 ± 5,1 a
Flubendiamida	60	52,9 ± 8,5 ab	41,3 ± 4,3 a
Metaflumizona	240	49,2 ± 1,7 ab	40,4 ± 3,9 a
Spirotetramat	75	55,3 ± 2,6 ab	37,4 ± 1,7 a
Sulfoxaflor	60	52, 5 ± 4,1 ab	29,2 ± 2,4 a

Las medias ± ES de cada tratamiento corresponden a cinco repeticiones (N = 15). En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

7.4.2.2.2. Efecto en la supervivencia de las ninfas

En la **Figura 53** se muestra la evolución de la supervivencia de las ninfas (ninfas en estadio N₃ que alcanzan la etapa adulta). En todos los tratamientos, incluido el control, se observa una disminución gradual en la supervivencia de las ninfas desde el primer día de exposición (siendo la

alimentación de presas contaminadas los días 1, 2 y 3). Los tratamientos de deltametrina ($80,0\% \pm 5,6$), flonicamida ($86,7\% \pm 4,7$), flubendiamida ($74,7\% \pm 8,5$), metaflumizona ($58,7\% \pm 10,4$) y spirotetramat ($76,0\% \pm 5,4$) tienen un comportamiento similar al testigo ($76,0\% \pm 5,4$), el único producto con diferencias estadísticas fue sulfoxaflor ($54,7\% \pm 5,7$) en el día 14 ($F = 2,58$; $df = 6, 28$; $P = 0,0409$).

Figura 53 Evolución de la supervivencia de ninfas N_3 alimentadas durante los tres primeros días con huevos de presa contaminados. Los valores hacen referencia a cinco repeticiones ($N = 15$). Las medias para cada tratamiento seguidas por asterisco (*) tienen diferencias con el testigo, con un nivel de significación de $P < 0,05$.

7.4.2.2.2. Efecto en la reproducción

Después de analizar el comportamiento de la reproducción con un ANOVA de dos vías (para unificar número de tratamientos entre factores se omitieron los valores del tratamiento de sulfoxaflor en el estado adulto), se encontraron diferencias en el número de descendientes según el factor

estado de desarrollo (*E*) e insecticida evaluado (*I*); sin embargo no existió interacción entre ambos factores (*E* × *I*) (**Tabla 23**).

Tabla 23 Estadísticos de ANOVA de dos vías para la reproducción obtenida por los adultos provenientes de ninfas N₃ o en adulto de *Nesidiocoris tenuis*, tras alimentarse con presa contaminada por diferentes insecticidas durante 72 h.

Factor	df	F	P
Estado de desarrollo (<i>E</i>)	1, 204	3,999	0,047
Insecticida (<i>I</i>)	5, 204	2,637	0,025
Estado × Insecticida (<i>E</i> × <i>I</i>)	5, 204	1, 564	0,172

Tras la contaminación de las ninfas por ingestión de presa tratada, todos los insecticidas disminuyeron significativamente el número de ninfas por hembra y día del depredador respecto del control ($4,6 \pm 0,7$) excepto deltametrina ($3,3 \pm 0,8$) y spirotetramat ($4,2 \pm 0,8$) ($F = 4,57$; $df = 6, 77$; $P = 0,0006$). Este parámetro no fue evaluado para el tratamiento de sulfoxaflor, pues aunque la supervivencia fue mayor al 50%, los individuos que lograron desarrollarse hasta el estado adulto tenían aspecto débil y seguían muriendo. En el caso del tratamiento de los adultos, el impacto en la reproducción fue aún mayor y sólo el tratamiento de spirotetramat ($5,3 \pm 0,7$) tuvo valores similares al testigo ($6,0 \pm 0,5$) ($F = 5,88$; $df = 6, 161$; $P < 0,0001$) (**Figura 54**).

Figura 54 Reproducción de adultos provenientes de ninfas (a) y adultos (b) del depredador que fueron alimentados durante 72 h con huevos tratados. Los valores corresponden a 12 repeticiones en el ensayo de ninfas y 24 en el ensayo de adultos (N = 1 macho y 1 hembra). Las medias $\pm$ ES por tratamiento (dentro de cada subfigura) seguidos por la misma letra no tienen diferencias entre ellas, con un nivel de significación de $P \geq 0,05$.

7.4.2.2.3. Efecto en la longevidad

Tras el análisis de ANOVA de dos vías, se observó que el estado de desarrollo (E), el insecticida (I) y la interacción entre los factores ($E \times I$)

tienen una influencia importante en la longevidad del depredador. Por tanto, la contaminación de los insecticidas vía trófica tiene un comportamiento diferente según el estado de desarrollo de *N. tenuis* alimentado con presa tratada (**Tabla 24**).

Tabla 24 Estadísticos de ANOVA de dos vías para la longevidad de los adultos provenientes de ninfas N₃ o adultos de *Nesidiocoris tenuis*, alimentados con presa contaminada por diferentes insecticidas durante 72 h.

Factor	df	F	P
Estado de desarrollo (E)	1, 91	154,082	< 0,001
Insecticida (I)	6, 91	9,493	< 0,001
Estado x Insecticida (E x I)	6, 91	3,323	0,005

La **Figura 55** muestra las curvas de supervivencia de cada tratamiento comparadas con la del control para el ensayo de ninfas de tercer estadio. Para deltametrina, flonicamida y sulfoxaflor hay una tendencia a la reducción respecto del control tanto al inicio ($Wilcoxon\ test = 11,3045$; $P = 0,0102$) como al final de la curva ($Log-Rank\ test = 14,2876$; $P = 0,0025$); sin embargo, los tratamientos de flubendiamida, metaflumizona y spirotetramat mostraron una tendencia diferente de la del control solo al final de la curva ($Wilcoxon\ test = 6,2030$; $P = 0,10213$; $Log-Rank\ test = 9,87011$; $P = 0,0197$). A pesar de ello, no existen diferencias estadísticas en la longevidad de los adultos procedentes de las ninfas contaminadas ($F = 2,24$; $df = 6, 34$; $P = 0,0682$) (**Figura 56**). Estos valores en días fueron: control: $29,7 \pm 3,5$; spirotetramat: $25,4 \pm 2,5$; flubendiamida: $22,8 \pm 2,3$; metaflumizona: $22,2 \pm 2,7$; sulfoxaflor: $21,4 \pm 2,3$; deltametrina: $20,6 \pm 1,9$ y flonicamida: $18,1 \pm 2,7$.

La distribución de Weibull proporcionó un ajuste para los datos de supervivencia de adultos provenientes de ninfas contaminadas por ingestión obtenidos para todos los tratamientos, con R^2 superiores a 0,97 en la mayoría de los casos (Tabla 25 y Figura 55).

Figura 55 Curvas de supervivencia según la función Weibull para los adultos de *Nesidiocoris tenuis* provenientes de ninfas N₃ alimentadas durante 72 h con huevos de *Ephesia kuehniella* tratados con insecticida o sin tratar (testigo, color verde oscuro). Los valores corresponden a cinco repeticiones (N = 15).

Figura 56 Longevidad de ninfas N₃ (a) y adultos (b) del depredador *Nesidiocoris tenuis* cuando fueron alimentados con huevos de *Ephestia kuehniella* tratados con insecticida. Las medias $\pm$ ES corresponden a 5 repeticiones en el ensayo de ninfas y 10 en el ensayo de adultos (N = 15). En cada subfigura, los valores para cada tratamiento seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P \geq 0,05$).

Por otro lado, todos los tratamientos redujeron la longevidad en el ensayo de adultos, excepto deltametrina ($15,2 \pm 0,9$) y flubendiamida ($15,1 \pm 1,1$) ($F = 18,88$; $df = 6, 63$; $P < 0,0001$). En este caso, la longevidad se vio ligeramente afectada con los tratamientos de flonicamida ($13,0 \pm 0,7$) y spirotetramat ($14,5 \pm 0,8$) y ampliamente reducida por los tratamientos de metaflumizone ($7,9 \pm 1,0$) y sulfoxaflor ($7,4 \pm 1,0$), respecto al control ($17,7 \pm 0,6$ días) (**Figura 56**).

En concordancia con esto, se encontraron tendencias diferentes al inicio y final de la curva de supervivencia al analizar globalmente todos los tratamientos y el control ($W_{ilcoxon\ test} = 323.187$; $P < 0,0001$; $L_{og-Rank\ test} = 182,201$; $P < 0,0001$). Se observaron dos grupos de insecticidas, con los parámetros de escala (b) y forma (β) similares entre ellos y diferentes del testigo (Tabla 26). Un primer grupo formado por metaflumizona y sulfoxaflor ($W_{ilcoxon\ test} = 1,4938$; $P = 0,2216$, $L_{og-Rank\ test} = 0,5111$; $P = 0,4747$) y un segundo grupo formado por los insecticidas deltametrina, flonicamida, flubendiamida y spirotetramat, aunque para estos se detectaron ligeras diferencias significativas al final de la curva ($W_{ilcoxon\ test} = 6,6212$; $P = 0,085001$, $L_{og-Rank\ test} = 8,32236$; $P = 0,0397975$) (**Figura 57**).

La distribución de Weibull también proporcionó buenos ajustes para los datos de supervivencia obtenidos para todos los tratamientos cuando se alimentaron adultos con presa contaminada (**Tabla 25 y Figura 57**).

Figura 57. Curvas de supervivencia según la función Weibull para los adultos de *Nesidiocoris tenuis*, alimentados durante 72 h con huevos de *Euphestia kuehniella* tratados con insecticida o sin tratar (testigo, color verde oscuro). Los valores corresponden a cinco repeticiones (N = 15).

Tabla 25 Parámetros estimados por la función Weibull describiendo la supervivencia de ninfas N₃ y adultos de *Nesidiocoris tenuis* alimentados con huevos de *Ephestia kuehniella* durante 72 h.

Compuesto	Concentración (mg i.a./l)	Ninfas			Adultos		
		$b^a \pm SE$	$\beta^b \pm SE$	R^{2c}	$b^a \pm SE$	$\beta^b \pm SE$	R^{2c}
Testigo	-	36,5 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,06	0,99	20,8 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2	0,99
Deltametrina	12,5	22,4 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,05	0,99	17,4 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	0,99
Flonicamida	60	22,3 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,05	0,99	15,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	0,99
Flubendiamida	60	25,9 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,07	0,98	17,5 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,0	0,99
Metaflumizona	240	27,1 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,09	0,94	8,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,1	0,93
Spirotetramat	75	29,4 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,09	0,97	17,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	0,99
Sulfoxaflor	60	23,3 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,07	0,97	7,7 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,97

^aParámetro que determina la escala de la distribución Weibull. ^bParámetro que determina la forma de la distribución Weibull.

^cCoefficiente de determinación

7.4.3. Clasificación toxicológica de los insecticidas

Para el cálculo del efecto total, la evaluación de los efectos subletales fue de mayor importancia que la del efecto letal, puesto que dichos efectos fueron determinantes para la clasificación de los productos según ambos criterios de clasificación, en general más negativa en el estado adulto que para el estado de ninfa (**Tabla 26**).

Solo deltametrina y spirotetramat fueron considerados productos inocuos (categoría OILB 1) para las ninfas en tercer estadio. Flonicamida, flubendiamida y metaflumizona tuvieron una clasificación de cierta toxicidad (categoría OILB 2) por la reducción en el número de ninfas por hembra y día. Sulfoxaflor fue el único producto en la que se observaron diferencias según el criterio de clasificación utilizado, inocuo (categoría OILB 1) o ligeramente tóxico (categoría OILB 2) pero con la salvedad que no fue posible evaluar el efecto en la reproducción. Las mismas clasificaciones se mantuvieron tras alimentar a los adultos con presa tratada, a excepción de metaflumizona y sulfoxaflor, ambos productos incrementaron su impacto, pasando de categoría OILB 2 a categoría OILB 3 (moderadamente tóxicos).

Tabla 26 Clasificación OILB de los insecticidas para ambos estados de desarrollo de *Nesidiocoris tenuis* expuestos al contaminación de presa tratada con diferentes insecticidas modernos por contaminación de presa tratada.

Compuesto	Concentración (mg i.a./L)	Ninfas							Adultos					
		Mc	Sc	Rc	Lc	CM	ET	CT	Mc	Rc	Lc	CM	ET	CT
Deltametrina	12,5	0 (1)	1	1	1	1	1	1	0 (1)	28,3 (1)	1	1	28,3	1
Flonicamida	60	0 (1)	1	39,1 (2)	1	2	39,1	2	0 (1)	43,3 (2)	26,5 (1)	2	58,6	2
Flubendiamida	60	0 (1)	1	63,0 (2)	1	2	63,0	2	0 (1)	33,3 (2)	1	2	33,3	2
Metaflumizona	240	0 (1)	1	45,6 (2)	1	2	45,6	2	27,5 (1)	56,7 (2)	55,3 (2)	2	85,9	3
Spirotetramat	75	0 (1)	1	1	1	1	0	1	0 (1)	1	18,0 (1)	1	18,1	1
Sulfoxaflor	60	10,4 (1)	28,0 (1)	-	1	1	35,5	2*	35,5 (2)	56,7 (2)	58,1 (2)	2	88,2	3

Cuando no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P \geq 0,05$), se asignó el valor 0 en el caso de la mortalidad y 1 en los efectos subletales. Entre paréntesis se da la clasificación individual de los parámetros evaluados, según las categorías toxicológicas de laboratorio respecto el control: 1=inocuo (<30%), 2=ligeramente tóxico (30-79%), 3=moderadamente tóxico (80-99%) y 4=tóxico (>99). **Mc**: mortalidad corregida a las 72 h por la fórmula de Scheider-Orelli. **Sc**: Porcentaje de reducción de la supervivencia de ninfas de los tratamientos respecto el control, según la fórmula de Abbott. **Rc**: Porcentaje de reducción en la reproducción en el tratamiento respecto el control según la fórmula de Abbott. **Lc**: Porcentaje de reducción en la longevidad de los individuos en el tratamiento respecto el control según la fórmula Abbott. **CM**: Categoría según el efecto de mayor impacto. **ET**: Efecto total. **CT**: Clasificación según el efecto total. -: No fue posible evaluar este parámetro *Clasificación toxicológica sin uno o varios efecto subletales.

7.5. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los adultos del depredador *N. tenuis* fueron más susceptibles que sus ninfas en estadio N₃ a los insecticidas evaluados y coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos de exposición al residuo fresco (capítulo IV). Como ya se ha comentado, en general las etapas juveniles (larvas y ninfas) de los artrópodos depredadores se consideran el estado de desarrollo más susceptible a la contaminación con plaguicidas (Sterk et al. 1999, Medina et al. 2001). En el caso del depredador *N. tenuis*, la menor susceptibilidad de las ninfas por la contaminación a través de las presas tratada puede atribuirse a un menor consumo de proteína en comparación con el estado adulto (El Dessouski et al. 1976). La alimentación omnívora de *N. tenuis* les permite combinar la alimentación fitófaga con la carnívora a lo largo de todo su ciclo, pero existe un gradiente en su desarrollo en el que las ninfas tienen mayor afinidad por la alimentación de fluidos vegetales y los adultos prefieren el consumo de presas (Calvo y Urbaneja 2004).

Tras observar un consumo similar y elevado en todos los tratamientos, se asumió que la vía de contaminación ensayada fue válida. Esto no estaba garantizado *a priori*, ya que tanto las ninfas como los adultos del depredador podrían sobrevivir tres días alimentándose tan solo de fluidos vegetales (la judía verde incluida en la unidad experimental). Además, los insecticidas podrían provocar en el depredador una respuesta de repelencia o antialimentaria durante el periodo de alimentación con la presa tratada (72 h). Es sabido que los plaguicidas emiten volátiles que los insectos pueden reconocer como una señal de peligro y que les permite evitar el contacto y por tanto la alimentación con el alimento tratado

(Mongkalangoon et al. 2009). Por ejemplo, en el grupo de los piretroides diversos estudios han documentado respuestas de repelencia en distintos agentes benéficos (Takken 2002, Provost et al. 2003, Maund et al, 2011). Por otra parte, se han descrito efectos antialimentarios de algunos de los insecticidas evaluados en este capítulo, como por ejemplo, flonicamida, flubendiamida y metaflumizona (Tomlin 2009).

Ninguno de los insecticidas evaluados a través de esta forma de contaminación indirecta tuvo un efecto letal importante. Solo sulfoxaflor y metaflumizona produjeron mortalidad, pero en mucho menor grado que la observada en los ensayos residuales. Por el contrario, los efectos subletales fueron importantes en la mayoría de insecticidas.

Deltametrina no afectó a ningún parámetro en ninfas y en adultos, excepto en el caso de la reproducción de estos últimos, que se redujo ligeramente. Entre los estudios más recientes que apoyan la baja toxicidad de deltametrina vía ingestión sobre depredadores está el estudio de Mohaghegh et al. (2000), quienes observaron una mayor susceptibilidad del depredador *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae) en estado adulto comparado con el estado de ninfa, tras ser alimentados con agua contaminada con el piretroide, atribuyendo este comportamiento a una mayor detoxificación y tasa de excreción en ninfas que en adultos.

Flonicamida afectó a la reproducción cuando fue ingerido tanto por ninfas como por adultos y afectó también a la longevidad de estos últimos. Si se comparan los resultados en la reproducción (ya que la longevidad no fue evaluada en los ensayos residuales) fue un producto más tóxico que cuando se aplicó en sustrato inerte o vegetal. Se trata de un insecticida activo principalmente por ingestión, inhibiendo la alimentación de

pulgones y otros homópteros (Tomlin 2009). En coincidencia con los resultados obtenidos, Jalali et al. (2009) no observaron efecto letal cuando alimentaron a larvas L₄ del depredador *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) con áfidos contaminados durante 4 a 6 días y a hembras durante 3 días. Pezzini y Koch (2015) han demostrado toxicidad aguda de este producto en *O. insidiosus*, pero a concentraciones muy superiores a las utilizadas en este trabajo (60 mg i.a./ha). En condiciones reales de campo, la evaluación de la supervivencia de los depredadores *O. insidiosus*, *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister) (Neuroptera: Chrysopidae), e *Hippodamia convergens* (Guerin-Meneville) (Coleoptera: Coccinellidae) a tratamientos de flonicamida utilizado para el control de áfidos (196,15 g i.a./ha) confirmó que este producto es un insecticida selectivo en el cultivo de soja. Incluso cuando se expuso a los adultos de *O. insidiosus* a doble contaminación (residual y oral), se redujo más del 70% la población de *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae), sin reducir la supervivencia del enemigo natural. Solo a una mayor concentración del producto (339,75 g i.a./ha) utilizada en condiciones de invernadero, se incrementó significativamente la mortalidad del antocórido. Respecto a la toxicidad crónica en enemigos naturales de este insecticida, no se han encontrado referencias para contaminación vía oral.

El producto flubendiamida es un insecticida activo por ingestión (Tomlin 2009) ampliamente conocido por su acción sobre lepidópteros (Gentz et al. 2010) debido a que presenta receptores diferentes en distintas especies (Qi y Casida 2013). Este producto mostró un impacto negativo en la reproducción de *N. tenuis* tras alimentarse con huevos tratados. En otros estudios sobre agentes benéficos, este insecticida no causó efectos en la mortalidad, alimentación, longevidad o reproducción de *Bombus impatiens* Cresson (Hymenoptera: Apidae) alimentados durante 30 días con una

solución de polen y miel contaminada con la diamida chlorantraniliprol (25 mg i.a./ha) (Gradish et al. 2010). Gontijo et al. (2015) tampoco encontraron efectos letales cuando adultos del depredador *O. insidiosus* se alimentaron de tallos procedente de semillas de girasol tratadas con la diamina chlorantraniliprol (18 mg i.a./ha). Sin embargo, sí observaron un retraso en el inicio de la oviposición de las hembras.

Spirotetramat solo afectó a la longevidad en el ensayo de adultos, por lo que fue catalogado como un producto inocuo (categoría OILB 1). Estos resultados coinciden con los del estudio realizado por Planes et al. (2013), en el cual se evaluó la contaminación por ingestión de presa tratada en el depredador *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) en parámetros de supervivencia, longevidad, fecundidad, fertilidad y mortalidad en estado de larva y pupa, sin causar ningún efecto negativo. Por el contrario Liu et al. (2012), tras estudiar el efecto de la mezcla de insecticida y miel (10%) en el parasitoide *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), observaron que aunque no se produjo un efecto negativo importante en la mortalidad de adultos, el porcentaje de parasitación sí se redujo drásticamente.

Los tratamientos de metaflumizona y sulfoxaflor fueron los más nocivos para el depredador en ambas etapas de desarrollo. No es muy amplia la información acerca de los efectos causados por estos productos cuando los agentes benéficos se contaminan por ingestión de presa tratada. Aunque es conocido el efecto de metaflumizona sobre insectos plaga pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Isoptera, Hemiptera e Himenoptera (BASF 2007, Salgado y Hayashi 2007), la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés Environmental Protection Agency) lo clasificó como un insecticida de bajo

riesgo con un impacto reducido en enemigos naturales y polinizadores (BASF 2007) por su actividad tras la ingestión del producto (BASF 2007, Tomlin 2009). Estudios de Gradish et al. (2010) lo citaron como un compuesto tóxico sobre adultos del polinizador *B. impatiens* tras su contaminación directa y por ingestión de polen contaminado y de igual forma también se cita como un compuesto que incrementa en gran medida la mortalidad de ninfas N₅ de *M. pygmaeus* después de 72 h de exposición por contaminación directa, residual y por ingestión (Martinou et al. 2014).

Por otra parte, sulfoxaflor es un nuevo insecticida perteneciente a las sulfoxaminas, que controla un amplio espectro de insectos plaga que se alimentan directamente de la savia de la planta (Babcock et al. 2011). Hasta donde se conoce, no existen estudios del efecto por cadena trófica o por ingestión de presas tratadas de este producto en agentes benéficos. Sin embargo, los resultados obtenidos son similares a los citados para tiametoxam e imidacloprid [ingredientes activos que comparte el modo de acción (IRAC 4) aunque en diferentes subgrupos al sulfoxaflor], compuestos que presentan el mismo modo de acción que el sulfoxaflor (IRAC 2016). Utilizando un método de exposición triple (directa, ingestión y residual) de tiametoxam, Martinou et al. (2014) observaron que este compuesto fue altamente tóxico para ninfas N₅ de *M. pygmaeus* causando un incremento en la mortalidad, reduciendo el número de presas consumidas y afectando parámetros de comportamiento como el aumento en el tiempo de descanso y acicalamiento y la disminución en el tiempo de alimentación sobre la planta.

Tillman (2006) reportó un importante efecto letal cuando ninfas y adultos de *Nezara viridula* (L.) se alimentaron de una dieta gelatinosa que contenía tiametoxam. Torres y Ruberson (2004) también obtuvieron una reducción

en el número ninfas y adultos de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) cuando los bebederos fueron contaminados con tiametoxam e imidacloprid. Finalmente, He et al. (2012) también observaron una reducción en la voracidad y la respuesta funcional de los adultos de *Serangium japonicum* Chapin (Coleoptera: Coccinellidae), tras ser alimentados con huevos de *B. tabaci* contaminados con imidacloprid; en este caso, los adultos se recuperaron rápidamente cuando la exposición terminó.

Chapter VIII. Conclusions

The conclusions of this work can be divided in two sections: first, regarding the IOBC methodology for evaluating non target effects of pesticides on natural enemies, and second, on the toxicity of insecticides evaluated on two predators *N. tenuis* and *M. basicornis*.

Regarding IOBC methodology,

The pesticides harmfulness for natural enemies can be underestimated by their feeding on plant sap, not only residual contact effect should be taken into account. Based on our results with *N. tenuis* and *M. basicornis* (vegetable substrate versus glass substrate), the ingestion effect should be considered besides the residual contact one.

Based in our results with mirids, the acute toxicity of pesticides with the same IRAC mode of action can be have similarly in closed related species. Therefore, certain degree of generalization seems to be possible, which is of great interest for IMP programs when there is not available information on an insecticide and/or natural enemy.

The IOBC statement that adults are the less susceptible life stag cannot be generalized. In this work, the *N. tenuis* nymphs (N₃) were less sensitive than the adults.

As lethal effects of pesticides don't provide enough information on the harmless to the natural enemies, sublethal effects must be studied and the pesticide total effect calculated taken into account.

The study of the functional response can be a useful tool to study the prey intake and assess the reduction in beneficial capacity of predators.

Ingestion of insecticides through contaminated prey produced a minor lethal effect on *N. tenuis* nymphs and adults. However, the important sublethal effects detected, highlight the interest of continuing these studies in more realistic conditions.

Regarding the toxicity of evaluated insecticides on the predator *N. tenuis* is possible concluded that:

Sulfoxaflor is a toxic product for the two development stages of the predator studied: residual contact (until semifield step) and contaminated prey intake. In addition, it exhibited a knock down effect and a long residual activity under our conditions.

Metaflumizone show an intermediate grade of acute toxicity. In addition, the recorded chronic toxicity of these insecticides has to be considered, especially when contamination is via ingestion of contaminated preys.

In laboratory assays, when nymphs or adults are in contact with insecticide residues, flubendiamide, flonicamide and spirotetramat are classified as harmless or slightly harmful (based on their total effect) in the sequential testing. However, when *N. tenuis* adults fed on contaminated preys flubendiamide and flonicamide exhibit severe impact on offspring production and longevity. Therefore, these results should be further investigated.

After use the sequential testing for the assessment of the acute toxicity of evaluated insecticides on *M. basicornis* is possible to conclude that:

The mirid is susceptible to deltamethrine and imidacloprid, whereas indoxacarb lost its lethal effect in semifield conditions. On the other hand, flubendiamide and spiromesifen do not produce mortality when the adults of *M. basicornis* are in contact with fresh residues of these insecticides.

With regard to the degradation of the residues, flubendiamide is non persistent, deltamethrine and spiromesifen are considered as short lived products (category IOBC A), while indoxacarb slightly persistence (category IOBC B), and imidacloprid as persistence (category IOBC D).

Capítulo IX. Referencias

- Adán, Á., Viñuela, E., Bengochea, P., Budia, F., del Estal, P., Aguado, P., & Medina, P. (2011). Lethal and sublethal toxicity of fipronil and imidacloprid on *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of economic entomology*, 104(5), 1541-1549.
- Agrobio (2016a). Información de efectos secundarios en enemigos naturales. <http://www.agrobio.es/informacion/efectos-secundarios/>. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrobio (2016b). Información de suelta y manejo de NESIcontrol 500. <http://www.agrobio.es/productos/control-de-plagas/nesidiocontrol-nesidiocoris-tenuis-control-trip-oruga-mosca-blanca/>. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrofit (2016a). Sistema de agrotóxicos fitosanitarios do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decis 25®. (Deltametrina). Registro 758498. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrofit (2016b). Sistema de agrotóxicos fitosanitarios do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Belt®. (Flubendiamida). Registro 2509. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrofit (2016c). Sistema de agrotóxicos fitosanitarios do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Provado®. (imidacloprid). Registro 6301. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrofit (2016d). Sistema de agrotóxicos fitosanitarios do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Rumo®. (indoxacarb). Registro 3500. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Agrofit (2016e). Sistema de agrotóxicos fitosanitarios do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Oberon®. (spiromesifen). Registro 1706.

- http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Ultimo acceso: 05-04-2016.
- Amor, F. (2013). Compatibilidad de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), depredadores importantes en cultivos hortícolas protegidos, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas. *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 187 pp.
- ANLA (2013). Autoridad Nacional de Licencias Ambientales. Resolución legal: Dictamen técnico ambiental para el producto formulado Closer 240 SC, a partir del ingrediente activo grado técnico sulfoxaflor. (http://www.anla.gov.co/documentos/9561_res_0869_191012.PDF). Ultimo acceso: 01-20-2013.
- APMVA. (2016). Australian pesticides and veterinary medicines authority. Public release summary on the evaluation of the new active constituent sulfoxaflor in the product transform insecticide. <http://apvma.gov.au/node/2786>. Último acceso: 05-05-2016.
- Arnó, J., Castañé, C., Riudavets, J., & Gabarra, R. (2010). Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). *Bulletin of entomological research*, 100(01), 105-115.
- Arnó, J., & Gabarra, R. (2011). Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Pest Science*, 84(4), 513-520.
- Babcock, J. M., Gerwick, C. B., Huang, J. X., Loso, M. R., Nakamura, G., Nolting, S. P., Rogers R. B., Sparks, T. C. Thomas, J., Watson, G., & Zhu, Y. (2011). Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest management science*, 67(3), 328-334.
- Bakker, F. M., & Jacas, J. A. (1995). Pesticides and phytoseiid mites: strategies for risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32(1): 58-67.
- Balachandran, A., Parajulee, M. N., & Kerns, D. L. (2014). Effect of Selected Insecticides on *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) Oviposition Behavior in Cotton. *Environmental entomology*, 43(1): 83-90.

- Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 363(1492), 761-776.
- BASF (2007). BASF Agricultural products, Metaflumizone Worldwide Technical Brochure, Limburgerhof, Germany.
http://www.agro.basf.com.ar/Uploads/productos_folletos/Alverde.pdf
- Bianchi, F. J. J. A., Booij, C. J. H., & Tscharntke, T. (2006). Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1595), 1715-1727.
- Bielza, P., Fernandez, E., Gravalos, C., Izquierdo, J. (2009) Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl*, 54(2): 229-236.
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., & Zappalà, L. (2012). Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere*, 87(7), 803-812.
- BOE (2012). Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. *BOE*, 223: 65127-65171.
- Bretschneider, T., Fischer, R., & Benet-Buchholz, J. (2005). Spiromesifen (Oberon®)–discovery, synthesis and X-ray structure. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 58(3), 307-318.
- Brück, E., Elbert, A., Fischer, R., Krueger, S., Kühnhold, J., Klueken, A. M., Nauen R., Niebes J. F., Reckmann U., Schnorbach H. J., Steffens, R. & van Waetermeulen X. (2009). Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection*, 28(10): 838-844.

- Bueno, V. H. P., Montes, F. C., Pereira, A. M., Lins, J. C., & van Lenteren, J. C. (2012). Can recently found Brazilian hemipteran predatory bugs control *Tuta absoluta*?. *IOBC-WPRS Bulletin*, 80, 63-67.
- Bueno, V. H. P., van Lenteren, J. C., Lins, J. C., Calixto, A. M., Montes, F. C., Silva, D. B., Santiago, L.D., & Pérez, L. M. (2013). New records of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) predation by Brazilian Hemipteran predatory bugs. *Journal of Applied Entomology*, 137(1-2): 29-34.
- Cabello, T., Bonfil, F., Gallego, J. R., Fernandez, F. J., Gamez, M., & Garay, J. (2015). Can Interactions Between an Omnivorous Hemipteran and an Egg Parasitoid Limit the Level of Biological Control for the Tomato Pinworm?. *Environmental entomology*, 44(1): 12-26.
- Calvo, F. J., Lorente, M. J., Stansly, P. A., & Belda, J. E. (2012). Preplant release of *Nesidiocoris tenuis* and supplementary tactics for control of *Tuta absoluta* and *Bemisia tabaci* in greenhouse tomato. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(2): 111-119.
- Calvo, J., & Urbaneja, A. (2003). *Nesidiocoris tenuis* (Het: Miridae) en tomate: Amigo o Enemigo. *Almería en Verde*, 4: 21-23.
- Calvo, J., & Urbaneja, A. (2004). *Nesidiocoris tenuis* un aliado para el control biológico de mosca blanca. *Horticultura Internacional*, 44: 20-25.
- Calvo, J., Bolckmans, K., Stansly, P. A., & Urbaneja, A. (2009). Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato. *BioControl*, 54(2): 237-246.
- Carvajal, G., Mougabure-Cueto, G., & Toloza, A. C. (2012). Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5): 675-679.
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 58: 99-117.
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future?. *Annual review of entomology*, 43(1): 1-16.
- Castañé, C., Arnó, J., Gabarra, R., & Alomar, O. (2011). Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological control*, 59(1): 22-29.
- Castilhos, R. V., Grützmacher, A. D., Nava, D. E., Zotti, M. J., Siqueira, P. R. B., & Spagnol, D. (2013). Selectivity of pesticides used in peach orchards on the larval

- stage of the predator *Chrysoperla externa* (Hagen). *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6Supl1), 3585-3596.
- Cho, S. R., Koo, H. N., Yoon, C., & Kim, G. H. (2011). Sublethal effects of flonicamid and thiamethoxam on green peach aphid, *Myzus persicae* and feeding behavior analysis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(6), 889-898.
- Claver, M. A., Ravichandran, B., Khan, M. M., & Ambrose, D. P. (2003). Impact of cypermethrin on the functional response, predatory and mating behaviour of a non-target potential biological control agent *Acanthaspis pedestris* (Stål) (Het., Reduviidae). *Journal of Applied Entomology*, 127(1): 18-22.
- Cloyd, R. A., & Dickinson, A. (2006). Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of economic entomology*, 99(5): 1596-1604.
- Croft, B. A. (1990). *Arthropod biological control agents and pesticides*. Ed. John Wiley and Sons Inc., New York, 703 pp.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3): 151-162.
- de Liñán, C. (2016). Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. 32ª edición. Ed. Agrotécnicas, Madrid, 832 pp. ISBN: 978-84-16389-22-3.
- de Oliveira, M. R., Amancio, E., Laumann, R. A., & Gomes, L. D. O. (2003). Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Gennadius) B biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Brasília, Brazil. *Neotropical Entomology*, 32(1): 151-154.
- de Puyseleir, V., De Man, S., Höfte, M., & De Clercq, P. (2013). Plantless rearing of the zoophytophagous bug *Nesidiocoris tenuis*. *BioControl*, 58(2): 205-213.
- DeBach, P. (1964). The scope of biological control. *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman & Hall, London, UK, 3-20.
- Decourtye, A., Henry, M., & Desneux, N. (2013). Environment: overhaul pesticide testing on bees. *Nature*, 497(7448): 188-188.

- Delbeke, F., Vercruysse, P., Tirry, L., De Clercq, P., & Degheele, D. (1997). Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga*, 42(3): 349-358.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 81-106.
- Díaz, I.H.L.B., LouzadaII, E., MouraII, N., de los Ángeles Martínez, M., & RiveroI, V.E.P.B. (2014). Life table of *Macrolophus basicornis* (Hemiptera: Miridae) preying on *Myzus persicae* (Sulzer) and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae). *Revista de Protección Vegetal*, 29(2): 94-98.
- Dolling, W. R. (1991). *Hemiptera*. Oxford University Press.
- ECPA (2015). European Crop Protection Association. Regulatory overview. <http://www.ecpa.eu/page/regulatory-overview>. Ultimo acceso: 01-11-2015.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4): 387-400.
- Elbert, A., Becker, B., Hartwig, J., & Erdelen, C. (1991). Imidacloprid-a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (Germany, FR)*.
- El-Dessouki, S. A., El-Kifl, A. H., & Helal, H. A. (1976). Life cycle, host plants and symptoms of damage of the tomato bug, *Nesidiocoris tenuis* Reut. (Hemiptera: Miridae), in Egypt. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 83(4): 204-220.
- EPA (2013). Environmental Protection Agency. Pesticide News Story: The EPA's Final Decision on the New Active Ingredient Sulfoxaflor. En: Pesticides News Story. EPA. United States. <http://www.epa.gov>. Ultimo acceso: 03-12-2013.
- EPA (2015). Environmental Protection Agent. Consideration of the FQPA Safety Factor and Other Uncertainty Factors in Cumulative Risk Assessment of Chemicals Sharing a Common Mechanism of Toxicity. <http://www2.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/consideration-fqpa-safety-factor-and-other>. Ultimo acceso: 28-10-2015.
- EPA (2016a). Environmental Protection Agency. Terms. Biological control. https://ofmpub.epa.gov/sor_internet/registry/termreg/searchandretrieve/termsandac

- ronyms/search.do?matchCriteria=Contains&checkedTerm=on&checkedAcronym=on&search=Search&term=biological%20control. Ultimo acceso: 06-03-2016.
- EPA (2016b). Environmental Protection Agent. Pesticides restricted. <https://www.epa.gov/pesticides#restricted>. Ultimo acceso: 13-04-2016.
- EPA (2016c). Sulfoxaflor. Final cancellation Order. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-11/documents/final_cancellation_order-sulfoxaflor.pdf. Ultimo acceso: 07-06-2016.
- Eveleigh, E. S., & Chant, D. A. (1981). Experimental studies on acarine predator-prey interactions: the numerical response of immature and adult predators (Acarina: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 59(7): 1407-1418.
- FAO (2000). Food and Agricultural Organization. Project Concept Paper. HEAL: Health in Ecological Agricultural Learning, prepared by the FAO programme for community IPM in Asia, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, http://www.fao.org/nars/partners/2nrm/proposal/9_2_6.doc Ultimo acceso: 20-04-2016.
- FAO (2016a). Food and Agricultural Organization. Glosario de términos fitosanitarios, plaga. <http://www.fao.org/docrep/w3587e/w3587e03.htm>. Ultimo acceso: 01-05-2016.
- FAO (2016b). Food and Agricultural Organization 2016a AGP. Integrated Pest Management. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/>. Ultimo acceso: 16-03-2016.
- FAO (2016c). Food and Agricultural Organization 2016a AGP. More about Integrated Pest Management. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/more-ipm/en/>. Ultimo acceso: 04-03-2016.
- Fauna Europaea. (2015a). Sistemática *Nesidiocoris tenuis*. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=452395. Último acceso: 17-03-2016.
- Fauna Europaea (2015b). Distribución *Nesidiocoris tenuis*. http://www.faunaeur.org/Maps/display_map_alternative.php?map_name=euro&map_language=en&taxon1=452395. Último acceso: 17-03-2016.

- Fedorka, K. M., & Mousseau, T. A. (2002). Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. *Animal Behaviour*, 64(3): 361-367.
- Fernández M. (2016). Compatibilidad de *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) y *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), importantes enemigos naturales de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos hortícolas, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas. *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 225 pp.
- Fernández, M. D. M., Medina, P., Fereres, A., Smagghe, G., & Viñuela, E. (2015). Are Mummies and Adults of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) Compatible With Modern Insecticides?. *Journal of Economic Entomology*, 108(5): 2268-2277.
- Figuls, M., Castañé, C., & Gabarra, R. (1999). Residual toxicity of some insecticides on the predatory bugs *Dicyphus tamaninii* and *Macrolophus caliginosus*. *Biocontrol*, 44(1), 89-98.
- Franco K. (2010). Biología y reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*. *Tesis Doctoral*. Universitat de Barcelona, 132 pp.
- Garzón, A., Medina, P., Amor, F., Viñuela, E., & Budia, F. (2015). Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere*, 132: 87-93.
- Gentz, M. C., Murdoch, G., & King, G. F. (2010). Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control*, 52(3), 208-215.
- Gharalari, A. H. (2012). Mortality and behavioral responses of adult potato psyllids, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), to insecticides. *Applied Entomological and Phytopathological*, 79(2): 1-14.
- Ghosh, A., Das, A., Samanta, A., Chatterjee, M. L., & Roy, A. (2013). Sulfoximine: A novel insecticide for management of rice brown planthopper in India. *African Journal of Agricultural Research*, 8(38): 4798-4803.

- Gitonga, L. M., Overholt, W. A., Löhr, B., Magambo, J. K., & Mueke, J. M. **(2002)**. Functional response of *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae). *Biological Control*, 24(1): 1-6.
- González-Núñez M, F Bahena & E Viñuela. **(1998)**. Desarrollo de un método de semicampo para estudio de los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre el parasitoidie *Opius concolor* Szèpligeti. *Bol San Veg Plagas*, 24: 661-668
- Goula, M. **(1985)**. *Cyrtopeltis (Nesidiocoris) tenuis* Reuter 1895 (Heteroptera: Miridae), nueva cita para la Península Ibérica. En *Segundo Congreso Ibérico de Entomología. Lisboa* (No. Suplemento 1, pp. 93-102).
- Gradish, A. E., Scott-Dupree, C. D., Frewin, A. J., & Cutler, G. C. **(2012)**. Lethal and sublethal effects of some insecticides recommended for wild blueberry on the pollinator *Bombus impatiens*. *The Canadian Entomologist*, 144(03): 478-486.
- Gradish, A. E., Scott-Dupree, C. D., Shipp, L., Harris, C. R., & Ferguson, G. **(2010)**. Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, 66(2): 142-146.
- Gradish, A. E., Scott-Dupree, C. D., Shipp, L., Harris, C. R., & Ferguson, G. **(2011)**. Effect of reduced risk pesticides on greenhouse vegetable arthropod biological control agents. *Pest management science*, 67(1): 82-86.
- Guedes, R. N. C., & Picanço, M. C. **(2012)**. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO bulletin*, 42(2): 211-216.
- Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J. D., & Desneux, N. **(2016)**. Pesticide-Induced Stress in Arthropod Pests for Optimized Integrated Pest Management Programs. *Annual review of entomology*, doi: 10.1146/annurev-ento-010715-023646.
- Gunning, R. V., & Devonshire, A. L. **(2002)**. Negative-cross resistance between indoxacarb and pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera*: a tool for resistance management. *Resistance Pest Management Newslettter*, 11, 52.
- Haji, F. N. P., Mattos, M. D. A., de Alencar, J. A., Barbosa, F. R., & Paranhos, B. **(2005)**. Manejo da mosca-branca na cultura do tomate. *Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica*.

- Harrewijn, P., & Kayser, H. (1997). Pymetrozine, a Fast-Acting and Selective Inhibitor of Aphid Feeding. In-situ Studies with Electronic Monitoring of Feeding Behaviour. *Pesticide Science*, 49(2): 130-140.
- Hassan, S. (1992) Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: Description of test methods. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/WPRS Bulletin*. 15(3): 1-3.
- Hassan, S. (1994). Activities of the IOLB/WPPS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *OILB-WPRS Bulletin* 17:1-5
- Hassan, S., Albert, R., Bigler, F., Blaisinger P., Bogenschutz, H., Boller, E., Brun, J., Chiverton, P., Edwards, P., Englert, W., Huang, P., Inglesfield, C., Naton, E., Oomen, P.A., Overmeer, W. P. J., Rieckmann, W., Samsøe-Petersen, L., Staubli, A., Tuset, J.J., Viggiani G. & Vanwetswinkel, G. (1987). Results of the third joint pesticide testing programme by the IOBC WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms" *OILB-WPRS Bulletin* 17:1-5.
- Hassell, M. P. (1978). *The Dynamics of Arthropod Predator-Prey Systems*. Princeton University Press.
- Hassell, M. P., Lawton, J. H., & Beddington, J. R. (1977). Sigmoid functional responses by invertebrate predators and parasitoids. *The Journal of Animal Ecology*, 46: 249-262.
- He, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Desneux, N., & Wu, K. (2012). Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the whitefly *Bemisia tabaci*. *Ecotoxicology*, 21(5): 1291-1300.
- Hernández, L. M., & Henry, T. J. (2010). Plant bugs, or Miridae (Hemiptera: Heteroptera), of Cuba. (*Pensoft Series Faunistica*), 92-212.
- Hernández, M., & Margalida, A. (2008). Pesticide abuse in Europe: effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. *Ecotoxicology*, 17(4), 264-272.
- Hinton, H. E. (1962). The structure of the shell and respiratory system of the eggs of *Helopeltis* and related genera (Hemiptera, Miridae). En: *Proceedings of the Zoological Society of London*, Blackwell Publishing Ltd., 39 (3): 483-488.

- Holling, C. S. (1959). Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *The Canadian Entomologist*, 91(07): 385-398.
- Horrigan, L., Lawrence, R. S., & Walker, P. (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental health perspectives*, 110(5), 445.
- Huang, J., Zhang, J., Wang, D., Zhang, L., Xu, Y., & Li, M. (2014). Do organic silicon and imidacloprid synergistically induce toxicity to the new invasive mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley on *Portulaca grandiflora* plants?. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2): 207-213.
- IOLB (2016a), International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants. IOBC . Working-group: Pesticides and beneficial organism. http://www.iobc-wprs.org/expert_groups/01_wg_beneficial_organisms.html.
- IOLB (2016b), International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants. IOBC Pesticides Side Effect. Data Base. https://www.iobc-wprs.org/ip_ipm/IOBC_Pesticide_Side_Effect_Database.html
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). (2016). Clasificación de los insecticidas según su modo de acción. <http://www.irac-online.org/documents/moa-classification/> Último acceso: 02-05-2016.
- Jacas, J., & E. Viñuela (1994). Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hymn.: Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Dip.: Tephritidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 147-154.
- Jacas, J.A. & Urbaneja, A. (2008). Origen de las plagas e historia del control biológico. En: Control biológico de plagas agrícolas. Editado por: Jacas, J.A. & Urbaneja, A. Phytoma-España, Valencia, 3-14.
- Jalali, M. A., van Leeuwen, T., Tirry, L., & De Clercq, P. (2009). Toxicity of selected insecticides to the two-spot ladybird *Adalia bipunctata*. *Phytoparasitica*, 37(4), 323-326.
- Jansen, J. P. (2000). A three-year field study on the short-term effects of insecticides used to control cereal aphids on plant-dwelling aphid predators in winter wheat. *Pest Management Science*, 56(6): 533-539.

- Joost, H. (2006). Flonicamid: a novel mode of action for piercing and sucking insects. En: *Beltwide Cotton Conferences, National Cotton Council, Memphis, TN*: 1583-1590.
- Juliano, S. A. (2001). Nonlinear curve fitting: predation and functional response curves. pp:178-196. En S. M. Scheiner and J. Gurevitch, editors. *Design and Analysis of Ecological Experiments*, Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Kato, K., Kiyonaka, S., Sawaguchi, Y., Tohnishi, M., Masaki, T., Yasokawa, N., Mizuno, Y., Mori, E., Inoue, K., Hamachi, I., Takeshima, H., & Mori, Y (2009). Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in the lepidopterous ryanodine receptor Ca^{2+} release channel. *Biochemistry*, 48(43): 10342-10352.
- Kerzhner, I.M. & Josifov, M. (1999) Cimicomorpha II Miridae. In: Aukema B, Rieger C (eds) *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region*, vol 3. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, pp 1–577.
- Koo, H. N., Lee, S. W., Yun, S. H., Kim, H. K., & Kim, G. H. (2015). Feeding response of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, to sublethal rates of flonicamid and imidacloprid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 154(2): 110-119.
- Koppert. 2016a. Koppert Biological Systems. Efectos secundarios. <https://www.koppert.es/efectos-secundarios/>. Ultimo acceso: 23-02-2016.
- Koppert. 2016b. Koppert Biological Systems. Ficha técnica de *Nesidiocoris tenuis*. <https://www.koppert.es/productos/productos-contraplagas-enfermedades/nesibug/>. Ultimo acceso: 20-02-2016.
- Koppert. 2016c. Koppert Biological Systems. Efectos secundários de *Macrolophus pygmaeus*. https://www.koppert.es/efectos-secundarios/?tx_koppertsideeffects_beneficialeffect%5BbiologyId%5D=36&cHash=703bd57d1eeff9b0d5db2a47cc4a40e6. Ultimo acceso: 15-03-2016.
- Lahm, G. P., Cordova, D., & Barry, J. D. (2009). New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12): 4127-4133.
- Lampropoulos, P. D., Perdakis, D. C., & Fantinou, A. A. (2013). Are multiple predator effects directed by prey availability?. *Basic and applied ecology*, 14(7): 605-613.
- Lee, C. Y. (2000). Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. *Journal of Biosciences*, 11: 107-112.

- Lefebvre, M., Bostanian, N. J., Mauffette, Y., Racette, G., Thistlewood, H. A., & Hardman, J. M. (2012). Laboratory-based toxicological assessments of new insecticides on mortality and fecundity of *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of economic entomology*, 105(3): 866-871.
- Lefebvre, M., Bostanian, N. J., Thistlewood, H. M., Mauffette, Y., & Racette, G. (2011). A laboratory assessment of the toxic attributes of six 'reduced risk insecticides' on *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). *Chemosphere*, 84(1): 25-30.
- Li, D. X., Tian, J., & Shen, Z. R. (2006). Effects of pesticides on the functional response of predatory thrips, *Scolothrips takahashii* to *Tetranychus viennensis*. *Journal of Applied Entomology*, 130(5): 314-322.
- Linnavuori, R. E. (2007). Studies on the Miridae (Heteroptera) of Gilan and the adjacent provinces in northern Iran. II. List of species. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, (47): 17-56.
- Lins Jr. J.C. (2014). Search capacity, prey preference, predation rates and reaction to prey and predator induced volatiles of predatory mirids of two tomato pests, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae) and *Bemisia tabaci* (Hem.: Aleyrodidae). *Tesis Doctoral*. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 116 pp.
- Liu, P., Liu, Y., Liu, Q., & Liu, J. (2010). Photodegradation mechanism of deltamethrin and fenvalerate. *Journal of Environmental Sciences*, 22(7): 1123-1128.
- Liu, T. X., Zhang, Y. M., Peng, L. N., Rojas, P., & Trumble, J. T. (2012). Risk assessment of selected insecticides on *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(2), 490-496.
- Lowery, D. T., & Smirle, M. J. (2003). Comparison of bioassay techniques for determining baseline susceptibilities to imidacloprid for green apple aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 96(6): 1864-1871.
- Lucas, É., & Alomar, O. (2002). Impact of the presence of *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae) on whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) predation by *Macrolophus caliginosus* (Wagner) (Heteroptera: Miridae). *Biological Control*, 25(2): 123-128.

- Lucas, É., & Rosenheim, J. A. (2011). Influence of extraguild prey density on intraguild predation by heteropteran predators: A review of the evidence and a case study. *Biological Control*, 59(1): 61-67.
- MAGRAMA (2016). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro oficial de productores y operadores de medios de defensa fitosanitaria (ROPO). <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/ropo/default.aspx>. Último acceso 13-06-2016.
- MAGRAMA (2016a). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Lista comunitaria de sustancias aprobadas, excluidas y en evaluación comunitaria y lista de sustancias básicas. http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_Sustancias_activas_aceptadas_excluidas.pdf. Último acceso: 14-06-2016.
- MAGRAMA (2016b). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Registro de productos fitosanitarios, Decis Protech® (Deltametrina). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23545.pdf>. Último acceso: 14-06-2016.
- MAGRAMA (2016c). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de productos fitosanitarios, Teppeki® (Flonicamida). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/24526.pdf>. Último acceso: 14-06-2016.
- MAGRAMA (2016d). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de productos fitosanitarios, Fenos® (Flubendiamida). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25279.pdf>. Último acceso: 14-06-2016.
- MAGRAMA (2016e). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de productos fitosanitarios, Alverde® (Metaflumizona). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25414.pdf>. Último acceso: 14-06-2016.
- MAGRAMA (2016f). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de productos fitosanitarios, Movento® (Spirotetramat).

- <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25298.pdf>. Último acceso: 14-06-2016.
- Malaquias, J. B., Ramalho, F. S., Omoto, C., Godoy, W. A. C., & Silveira, R. F. (2014). Imidacloprid affects the functional response of predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) to strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on Bt cotton. *Ecotoxicology*, 23(2): 192-200.
- MAPA (2016). Ministério da agricultura. Pesticide Plant Protection System. Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. (http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) (accessed: 19 Feb 2015) (In Brazilian).
- Marčić, D., Perić, P., & Milenković, S. (2011). Acaricides–biological profiles, effects and uses in modern crop protection. *Pesticides–Formulations, effects, fate. InTech*. 6, 37-62.
- Marco, V. (1994). Efectos del RCI Hexaflumuron sobre dos lepidópteros plaga: *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep: Pyralidae) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep: Noctuidae). *Tesis Doctoral*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 244 pp.
- Martínez, A. (2012). Basf lanza al mercado un nuevo insecticida contra larvas de lepidópteros en hortalizas y el escarabajo de la patata. *Vida Rural*, 344: 54-55.
- Martínez-González, M. A., Fajardo, A. F., Martínez-González, F. J. M. A., Sánchez-Villegas, A., & Fajardo, F. J. F. (2001). *Bioestadística amigable* pp:501.
- Martinou, A. F., Seraphides, N., & Stavrinides, M. C. (2014). Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. *Chemosphere*, 96, 167-173.
- Martinou, A. F. & Stavrinides, M. C. (2015). Effects of Sublethal Concentrations of Insecticides on the Functional Response of Two Mirid Generalist Predators. *PloS one*, 10(12).
- Maselou, D. A., Perdakis, D. C., Sabelis, M. W. & Fantinou, A. A. (2014). Use of plant resources by an omnivorous predator and the consequences for effective predation. *Biological Control*, 79, 92-100.
- Maus, C. (2008). Ecotoxicological profile of the insecticide spirotetramat. *Bayer CropScience J.*, 61, 159-180.

- May, W. E., Soroka, J. J., Loeppky, H. A., & Murrell, D. C. **(2003)**. The effects of trichlorfon and deltamethrin on alfalfa plant bug and *lygus* bug (Heteroptera: Miridae) populations in alfalfa grown in Canada. *Crop Protection*, 22 (6): 883-889.
- Medina, P., Budia, F., Tirry, L., Smagghe, G. & Viñuela, E. **(2001)**. Compatibility of spinosad, tebufenozide and azadirachtin with eggs and pupae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology* 11(5), 597-610.
- Medina, P., Adán, A., del Estal, P., Budia, F., & Viñuela, E. **(2008)**. Integración del control biológico con otros métodos de control. En: *Control biológico de plagas agrícolas* (pp. 469-476). Phytoma España: 469-476.
- Medina, P., Manzanares, G., Izarra, R., Adán, A., Smagghe, G. & Viñuela, E. **(2012)**. Influence of insecticide persistence on the survival of the two braconid parasitoids *Chelonus inanitus* and *Aphidius ervi*. *IOBC/wprs Bull* 80: 271-222.
- Medina, P.; Budia, F.; del Estal, P.; Adán, A.; Viñuela, E. **(2003)**. Side effects of six insecticides on different developmental stages of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *IOBC/wprs Bull.*, 26(5): 33-40.
- Melo, M. C., Dellapé, P. M., Carpintero, D. L., & Coscarón, M. D. C. **(2004)**. Reduviidae, Miridae y Lygaeoidea (Hemiptera) recolectados en Colonia Carlos Pellegrini (Esteros de Iberá, Corrientes, Argentina). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63(1-2), 59-67.
- Moens, J., Clercq, P.D. & Tirry, L. **(2011)**. Side Effects of Pesticides on the Larvae of the *Hoverfly episyrphus* Balteatus in the Laboratory, *Phytoparasitica*. 39:1-9.
- Mohaghegh, J., Clercq, P. D., & Tirry, L. **(2000)**. Toxicity of selected insecticides to the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biocontrol Science and Technology*, 10(1), 33-40.
- Mollá, O., Biondi, A., Alonso-Valiente, M., & Urbaneja, A. **(2014)**. A comparative life history study of two mirid bugs preying on *Tuta absoluta* and *Ephestia kuehniella* eggs on tomato crops: implications for biological control. *BioControl*, 59(2), 175-183.
- Mongkalagoon, P., Grieco, J. P., Achee, N. L., Suwonkerd, W., & Chareonviriyaphap, T. **(2009)**. Irritability and repellency of synthetic pyrethroids on an *Aedes aegypti* population from Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 34(2), 217-224.

- Montes, F.C. (2013). Características biológicas dos estágios imaturos de três predadores (Hem.: Miridae) alimentados com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep.:Pyralidae) em cinco temperaturas. *Tesis Maestria*. Universidade Federal de Lavras, UFLA, 56 pp.
- Montilla, J., Londoño, M. E., Monsalve, D. A., & Correa, G. A. (2014). Evaluation of Insecticides for *Monalonion velezangeli*, Carvalho & Costa (Hemiptera: Miridae) management in Avocado. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 67(1), 7141-7150.
- Moreno-Ripoll, R., Gabarra, R., Symondson, W. O. C., King, R. A., & Agustí, N. (2012). Trophic relationships between predators, whiteflies and their parasitoids in tomato greenhouses: a molecular approach. *Bulletin of Entomological Research*, 102(04), 415-423.
- Morita, M., Ueda, T., Yoneda, T., Koyanagi, T., Haga, T. (2007). Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science*, 63: 969-973.
- Moscardini, V. F., da Costa Gontijo, P., Carvalho, G. A., de Oliveira, R. L., Maia, J. B., & Silva, F. F. (2013). Toxicity and sublethal effects of seven insecticides to eggs of the flower bug *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Chemosphere*, 92(5), 490-496.
- Moura, A. P., Carvalho, G.A., & Botton, M. (2012). Residual effect of pesticides used in integrated apple production on *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) larvae. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 217.
- Murray, G. P., Stillman, R. A., Gozlan, R. E., & Britton, J. R. (2013). Experimental predictions of the functional response of a freshwater fish. *Ethology*, 119(9), 751-761.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., & Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, 57(7), 577-586.
- Nauen, R., Koob, B., & Elbert, A. (1998). Antifeedant effects of sublethal dosages of imidacloprid on *Bemisia tabaci*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 88(3), 287-293.

- Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J. & Thielert, W. **(2008)**. Biological profile of spirotetramat (Movento®) – a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropSci. J.*, 61(2): 245-278.
- Oaten, A., & Murdoch, W. W. **(1975)**. Functional response and stability in predator-prey systems. *American Naturalist*, 289-298.
- OJEU **(2009)**. Official Journal of the European Union. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. OJEU, 309: 71-86.
- OJEU **(2015)**. Official Journal of the European Union. Regulation 1107/2009 of the European Parliament and council of 27 July 2015, L. 199: 8-11.
- Overmeer, W. P. J., & Van Zon, A. Q. **(1982)**. A standardized method for testing the side effects of pesticides on the predacious mite, *Amblyseius potentillae* [Acarina: Phytoseiidae]. *Entomophaga*, 27(4): 357-363.
- Parra, J. R., & Zucchi, R. A. **(2004)**. Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 37, n. 3, p. 271-281.
- Pezzini, D. T., & Koch, R. L. **(2015)**. Compatibility of flonicamid and a formulated mixture of pyrethrins and azadirachtin with predators for soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) management. *Biocontrol Science and Technology*, 25(9): 1024-1035.
- Pflüger, W., & Schmuck, R. **(1991)**. Ecotoxicological profile of imidacloprid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (Germany, FR)*.
- Pimentel D., **(1997)**. Pest Managment in Agriculture. En: Techniques for reducing pesticides use. Economic and Environmental Benefits. Pimentel, D. (ed.). 1-50.
- Pinder III, J. E., Wiener, J. G., & Smith, M. H. **(1978)**. The Weibull distribution: a new method of summarizing survivorship data. *Ecology*, 175-179.
- Planes, L., Catalán, J., Tena, A., Porcuna, J. L., Jacas, J. A., Izquierdo, J., & Urbaneja, A. **(2013)**. Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Journal of Pest Science*, 86(2): 321-327.

- PMRA (2016). Pest Management Regulatory Agency. Registration Decision Statement^F for Sulfoxaflor. http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/_decisions/rd2016-12/index-eng.php. Ultimo acceso: 03-02-2016.
- Poletti, M., Maia, A. H. N., & Omoto, C. (2007). Toxicity of neonicotinoid insecticides to *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) and their impact on functional response to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biological Control*, 40(1): 30-36.
- Potter, C. (1952). An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.*, 39: 1-28.
- Pozzebon, A., Borgo, M., & Duso, C. (2010). The effects of fungicides on non-target mites can be mediated by plant pathogens. *Chemosphere*, 79(1): 8-17.
- Prabhaker, N., Castle, S. J., Naranjo, S. E., Toscano, N. C., & Morse, J. G. (2011). Compatibility of two systemic neonicotinoids, imidacloprid and thiamethoxam, with various natural enemies of agricultural pests. *Journal of Economic Entomology*, 104(3): 773-781.
- Preetha, G., Manoharan, T., Kuttalam, S., & Stanley, J. (2008). Persistent Toxicity of Imidacloprid against Aphid, *Aphis Gossypii* and Leafhopper, *Amrasca Biguttula Biguttula* on Cotton. *Journal Pesticide Research*, 20(2): 197-200.
- Preetha, G., Stanley, J., Suresh, S., & Samiyappan, R. (2010). Risk assessment of insecticides used in rice on miridbug, *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter, the important predator of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal.). *Chemosphere*, 80(5): 498-503.
- Püntener, W. (1981). Manual for field trials in plant protection, 2nd ed. Syngenta International AG. Switzerland.
- Qi, S., & Casida, J. E. (2013). Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(3), 321-326.
- R Development Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing. Austria R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- Řezáč, M., Pekár, S., & Stará, J. (2010). The negative effect of some selective insecticides on the functional response of a potential biological control agent, the spider *Philodromus cespitum*. *BioControl*, 55(4), 503-510.
- Riechert, S. E., & Lockley, T. (1984). Spiders as biological control agents. *Annual Review of Entomology*, 29(1), 299-320.
- Riechert, S. E., & Lockley, T. (1984). Spiders as biological control agents. *Annual Review of Entomology*, 29(1): 299-320.
- Riechert, S. E., & Lockley, T. (1984). Spiders as biological control agents. *Annual Review of Entomology*, 29(1): 299-320.
- Robledo A., van del Blom, J., Sánchez, J.A. & Torres, S. (2009). Control biológico en invernaderos hortícolas. Coexphal, Almeria. 176 pp.
- Rogers, D. (1972). Random search and insect population models. *The Journal of Animal Ecology*, 369-383.
- Roubos, C. R., Rodriguez-Saona, C., & Isaacs, R. (2014). Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. *Biological Control*, 75, 28-38.
- Ruberson, J. R., & Tillman, P. G. (1999). Effect of selected insecticides on natural enemies in cotton: laboratory studies. En: Proc. Beltwide Cotton Conf. 2. 1210-1213.
- Ruberson, J., Nemoto H., & Hirose Y. (1998). Pesticides and conservation of natural enemies in pest management. En: Conservation Biological Control. Barbosa P. (Ed.). 207-220.
- Sabelis, M. W. (1985). Long-range dispersal and searching behaviour. En: *Spider mites, their biology, natural enemies and control*, Universiteitsbibliotheek. pp: 141-160.
- Sáenz de Cabezón F. J., Zalom, F. G. & Thompson P. B. (2007). Residual toxicity of acaricides to *Galendromus occidentalis* and *Phytoseiulus persimilis* reproductive potential. *Biological Control*. 40: 153-159.
- Salgado, V. L., & Hayashi, J. H. (2007). Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. *Veterinary Parasitology*, 150(3): 182-189.
- Samsøe-Petersen, L. (1990). Sequences of standard methods to test effects of chemicals on terrestrial arthropods. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 19(3): 310-319.

- Sánchez, J. A. (2008). Zoophytophagy in the plantbug *Nesidiocoris tenuis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 10(2): 75-80.
- Sánchez, J. A., & Lacasa, A. (2008). Impact of the zoophytophagous plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) on tomato yield. *Journal of Economic Entomology*, 101(6): 1864-1870.
- Sánchez, J. A., Lacasa, A., Arnó, J., Castane, C., & Alomar, O. (2009). Life history parameters for *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Het., Miridae) under different temperature regimes. *Journal of Applied Entomology*, 133(2): 125-132.
- Sattar, S., Farmanullah, A., Arif, M., Sattar, H., & Qazi, J. I. (2011). Toxicity of some new insecticides against *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and extended laboratory conditions. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(6): 1117-1125.
- Schnorbach, J., Elbert, A., Laborie, B., Navacerrada, J., Bangels, E., & Gobin, B. (2008). Movento®, an ideal tool for integrated pest management in pomefruit, citrus and vegetables. *Bayer CropScience Journal*, 61(2): 377-402.
- Schreinemachers, P., & Tipraqsa, P. (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37 (6): 616-626.
- Sharpe, R. M., & Irvine, D. S. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?. *Bmj*, 328 (7437): 447-451.
- Shono, T., Zhang, L., & Scott, J. G. (2004). Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80(2): 106-112.
- SIAR, (2016). Sistema de información Agroclimática para el Regadío del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. <http://eportal.magrama.gob.es/WEBSIAR/SeleccionParametrosMap.aspx?dst=1>.
Último acceso: 01-06-2016.
- Silva, D. B., Bueno, V. H., Montes, F. C., & van Lenteren, J. C. (2016). Population growth of three mirid predatory bugs feeding on eggs and larvae of *Tuta absoluta* on tomato. *BioControl*: 1-9.
- Silva, R. A., Carvalho, G. A., Carvalho, C. F., & Bastos Silva D. (2012). Effects of pesticides on eggs of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and

- consequences on subsequent development. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1): 58-63.
- Siqueira, H. Á. A., Guedes, R. N. C., & Picanço, M. C. (2000). Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 2(2): 147-153.
- Solans, P., & Izquierdo Casas, J. I. (1997). Toxicologia en laboratori d'insecticides piretroides sobre els depredadors *Macrolophus caliginosus* Wagner i *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae). *Quaderns Agraris*, 7-19.
- Souza, J. D., Reis, P. R., Gomes, J., Nacif, A., & Salgado, L. (1983). Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte: Epamig, 1983. 15 p. *Boletim técnico*, 2.
- Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., & Thomas, J. D. (2013). Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1): 1-7.
- Stark, J. D., Jepson, P. C., & Mayer, D. F. (1995). Limitations to use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the field. *Journal of Economic Entomology*, 88(5): 1081-1088.
- Stark, J. D., Vargas, R., & Banks, J. E. (2007). Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents. *Journal of Economic Entomology*, 100(4): 1027-1032.
- Sterk, G., Hassan, S. A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blümel, S., Bogenschütz, H., Boller, E., Bromand, B., Brun, J., Calis, J.N.M., Coremanspelseneer, J., Duso, C., Garrido, A., Grove, A., Heimbach, U., Hokkanen, H., Jacas, J., Lewis, G.B., Moreth, L., Polgar, L., Roversti, L., Samsøe-Petersen, L., Sauphanor, B., Schaub, A., Stäubli, A., Tuset, J.J., Vainio, A., van de Veire, M., Viggiani, G., Viñuela, E. & Vogt, H. (1999). Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'. *BioControl*, 44(1): 99-117.
- Sterk, G., Jans, K., Put, K., Wulandari, O. V., Uyttendaele, M. (2003). Toxicity of chemical and biological plant protection products to beneficial arthropods. En: *Colloque international tomate sous abri, protection intégrée-agriculture biologique*, Avignon, France,

- 17-18 et 19 septembre 2003. (pp. 113-118). Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. Roche, L.;Edin, M.;Mathieu, V.;Laurens, F. (Eds.).
- STSC (1897). Statgraphics user's guide, Version 5.1. Graphic software system, STSC, Rockville, MD, USA.
- Studebaker, G. E., & Kring, T. J. (2000). Lethal and sublethal effects of early-season insecticides on Insidious flower bug (*Orius insidiosus*): an important predator in cotton. *Special Reports-university of Arkansas Agricultural Experiment Station*, 198: 221-225.
- SYSTAT (2002). SYSTAT for Windows, version 10.2. SYSTAT software Inc., California.
- Takagi, K., Hamaguchi, H., Nishimatsu, T., & Konno, T. (2007). Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. *Veterinary Parasitology*, 150: 177-181.
- Talebi, K., Kavousi, A., & Sabahi, Q. (2008). Impacts of pesticides on arthropod biological control agents. *Pest Technology*, 2(2): 87-97.
- Tanaka, K., Endo, S., & Kazano, H. (2000). Toxicity of insecticides to predators of rice planthoppers: Spiders, the mirid bug and the dryinid wasp. *Applied Entomology and Zoology*, 35(1): 177-187.
- Téllez, M.M. & Tapia, G. (2006). *Nesidiocoris tenuis* Reuter, un depredador polífago. *Horticultura*, 193: 62-65.
- Theiling, K. M., & Croft, B. A. (1988). Pesticide side-effects on arthropod natural enemies: a database summary. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 21(3): 191-218.
- Theodoridis G. (2006). Fluorine-containing agrochemicals: an overview of recent developments *Advances in fluorine sciences*. 2: 121-175.
- Thomson, L. J., & Hoffmann, A. A. (2006). Field validation of laboratory-derived IOBC toxicity ratings for natural enemies in commercial vineyards. *Biological Control*, 39(3): 507-515.
- Tillman, P. G., Hammes, G. G., Sacher, M., Connair, M., Brady, E. A., & Wing, K. D. (2002). Toxicity of a formulation of the insecticide indoxacarb to the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), and the big-eyed bug, *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Pest Management Science*, 58(1): 92-100.

- Tohnishi, M., Nakao, H., Furuya, T., Seo, A., Kodama, H., Tsubata, K., Fujioka S., Kodama, H., Hirooka, T., & Nishimatsu, T. **(2005)**. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. *Journal of Pesticide Science*, 30(4): 354-360.
- Tomlin, C.D.S. **(2009)**. The pesticide manual. A world compendium. Ed. BCPC, Hampshire, 1457 pp.
- Urbaneja, A., Montón, H., & Mollá, O. **(2009)**. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology*, 133(4): 292-296.
- Urbaneja, A., Pascual-Ruiz, S., Pina, T., Abad-Moyano, R., Vanaclocha, P., Montón, H., Castañera, P., Dembilio, O. & Jacas, J. A. **(2008)**. Efficacy of five selected acaricides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their side effects on relevant natural enemies occurring in citrus orchards. *Pest Management Science*, 64(8): 834-842.
- Urbaneja, A., Tapia, G., & Stansly, P. **(2005)**. Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae). *Biocontrol Science and Technology*, 15(5): 513-518.
- Valderrama, K., Granobles, J., Valencia, E., & Sánchez, M. **(2007)**. *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) depredador en el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2): 141-145.
- van Aplen, J. J. M., & Jervis M. A. **(1996)**. Foraging behaviour, pp. 1-62. En: Jervis, M. A.; Kidd, N. A. C. (eds.). *Insect natural enemies: practical approaches to their study and evaluation*. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 723 p.
- van de Veire, M., Sterk, G., Van der Staij, M., Ramakers, P. M. J., & Tirry, L. **(2002)**. Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. *BioControl*, 47(1): 101-113.
- van de Veire, M., & Tirry, L. **(2003)**. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: "worst case" laboratory tests. *IOBC/WPRS Bulletin*, 26(5), 41-50.
- van de Veire, M., Viñuela, E., Bernardo, U., Tirry, L., Adán, A. & Viggiani, G. **(2004)**. Duration of the toxicity of abamectin and spinosad on the parasitic wasp *Encarsia formosa* in Northern and Southern Europe. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28(7): 245-249.

- Vogt, H., Bigler, F., Brown, K., Candolfi, M. P., Kemmeter, F., Kühner, C., Moll, M., Travis, A., Ufer, A., Viñuela E., Waldburger, M. & Waldburger, M. **(2000)**. Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*, 27-44.
- Wiedenmann, R. N., & Smith, J. W. **(1997)**. Attributes of natural enemies in ephemeral crop habitats. *Biological Control*, 10(1): 16-22.
- Wilson, C., & Tisdell, C. **(2001)**. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics*, 39(3): 449-462.
- Wing, K. D., Andalaro, J. T., McCann, S. F., & Salgado, V. L. **(2010)**. Indoxacarb and the sodium channel blocker insecticides: chemistry, physiology and biology in insects. *Insect Control Biological and Synthetic Agents*, 35-57.
- Wing, K. D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M., & Schnee, M. **(2000)**. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Protection*, 19(8): 537-545.
- Wu, J., Li, J. L., Peng, W. J., & Hu, F. L. **(2010)**. Sensitivities of three bumblebee species to four pesticides applied commonly in greenhouses in China. *Insect Science*, 17(1): 67-72.
- Zalom, F. G. **(2010)**. Pesticide use practices in integrated pest management. En: *Handbook of Pesticide Toxicology*, Editado por: Krieger, R. Academic Press, Londrés, 303-313.
- Zappalà, L., Biondi, A., Alma, A., Al-Jboory, I. J., Arnò, J., Bayram, A., Chailleux, A., El-Arnaouty, A., Gerling, D., Guenaoui, Y., Shaltiel-Harpaz, L., Siscaro, G., Stavrinides M., Tavella L., Vancher R., Urbaneja A. & Desneux N. **(2013)**. Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. *Journal of Pest Science*, 86(4): 635-647.
- Zhu, Y., Loso, M.R., Watson, G.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B., Huang, J.X., Gerwick, B.C., Babcock, J.M., Kelley, D., Hegde, V.B., Nugent, B.M., Renga, J.M., Denholm, I., Gorman, K., DeBoer, G.J., Hasler, J., Meade, T. & Thomas, J.D. **(2011)**. Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (7): 2950-295.